

Regulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems in Säugetierzellen durch den Transkriptionsfaktor TCF11

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biochemiker Janos Steffen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:

1. Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel
2. Prof. Dr. Andreas Herrmann
3. Prof. Dr. Michael Groll

Tag der mündlichen Prüfung: 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).....	1
1.1.1 Ubiquitin	1
1.1.2 Die Ubiquitinierungskaskade von Proteinen	2
1.1.3 E3-Enzyme (Ubiquitin-Ligasen)	4
1.1.4 Die ER-assoziierte Protein Degradation (ERAD).....	5
1.1.5 Aufbau des 20S Proteasoms	7
1.1.6 Biogenese des 20S Proteasoms	9
1.1.7 Regulatorkomplexe des 20S Proteasoms.....	10
1.1.8 Der 19S Regulatorkomplex (PA700)	11
1.1.9 Das Hybridproteasom	12
1.1.10 Proteasominhibitoren	13
1.1.11 Transkription der proteasomalen Gene	13
1.2 Der ARE-Nrf2-Keap1-Signalweg	14
1.3 Der Transkriptionsfaktor c-Jun	17
1.4 Die Transkriptionsfaktoren TCF11/Nrf1	17
1.5 Zielsetzung	20
2 Materialien und Methoden	21
2.1 Verwendete Chemikalien	21
2.2 Zellkultur	21
2.2.1 Zellen und Medien	21
2.2.2 Kultivierung von adhärenenten Zellen	21
2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	22
2.2.4 Ernten und Aufschluss von humanen adhärenenten Zellen	22
2.2.5 Transfektion von Säugetierzellen mit Plasmid-DNA	22
2.2.6 Transfektion von siRNA	24
2.2.7 Immunzytochemie.....	26
2.2.8 Cycloheximid „chase“	26
2.2.9 Metabolische ³⁵ S-markierung von Zellen und Immunpräzipitation (IP) von 20S Proteasomen	26
2.2.10 <i>In vivo</i> Ubiquitinierung	27
2.2.11 MTT-Assay	28
2.3 Proteinbiochemische Methoden	28

2.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	28
2.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	28
2.3.3	Western Blot	29
2.3.3.1	Proteintransfer	29
2.3.3.2	Proteindetektion mittels Immunreaktion.....	29
2.3.3.3	Strippen der Membran	30
2.3.4	Nicht-denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (NATIVE-PAGE).....	31
2.3.5	Trennung von nicht-nukleären und nukleären Proteinen	31
2.3.6	Trennung von cytosolischen, membrangebundenen und nukleären Proteinen.....	32
2.3.7	Koimmunpräzipitation von Proteinen	32
2.4	Molekularbiologische Methoden	33
2.4.1	Klonierungsmethoden in <i>E.coli</i>	33
2.4.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
2.4.1.2	Reinigung der PCR-Produkte	34
2.4.1.3	Restriktion von DNA	34
2.4.1.4	Agarosegelelektrophorese	35
2.4.1.5	Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel	35
2.4.1.6	Ligation	35
2.4.1.7	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E.coli</i>	35
2.4.1.8	Anzucht von <i>E.coli</i>	36
2.4.1.9	Minipräparation von Plasmid-DNA.....	36
2.4.1.10	Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	36
2.4.1.11	Zielgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA	37
2.4.2	Arbeiten mit RNA	37
2.4.2.1	Gewinnung von RNA aus Säugetierzellen.....	37
2.4.2.2	Herstellung von cDNA	37
2.4.2.3	Reverse Transkription-PCR (RT-PCR).....	38
2.4.2.4	real-time PCR	38
2.4.2.5	Affimetrix Microarray.....	38
2.5	Funktionelle Analysen	38
2.5.1	CAT-ELISA	38
2.5.2	<i>In vitro</i> Expression von Proteinen	39
2.5.3	Radioaktives Markieren von doppelsträngiger DNA und EMSA.....	39
2.5.4	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	39
2.6	Datenbanken/Programme	41
2.7	Statistische Analysen	41

3 Ergebnisse	42
3.1 Regulation der proteasomalen Genexpression	42
3.1.1 Proteasominhibition führt zu oxidativem Stress innerhalb der Zelle	42
3.1.2 Die humanen proteasomalen Promotoren enthalten AREs	43
3.1.3 Genauere Analyse des PSMB6-Promotors	44
3.1.4 Untersuchung der Expression des PSMB6 Gens nach Proteasominhibition mittels eines Reportergenassays	45
3.1.5 Verstärkte Bindung von nukleären Proteinen an das ARE-17 nach Proteasominhibition	47
3.1.6 Die verwendete Epoxomicin Konzentration war nicht toxisch	48
3.1.7 Die Überexpressionen von TCF11, Nrf2 und c-Jun führen zur Aktivierung des PSMB6-Promotors	49
3.1.8 TCF11 und Nrf2 binden <i>in vitro</i> jeweils als Dimer mit MafG an das ARE-17 ..	51
3.1.9 Die Überexpression von TCF11 aktiviert die Transkription von endogenen proteasomalen Genen und führt zu neu assemblierten Proteasomkomplexen	52
3.1.10 TCF11, Nrf2 und c-Jun akkumulieren nach Proteasominhibition im Zellkern ..	57
3.1.11 TCF11/Nrf1 binden nach Proteasominhibition verstärkt an AREs von proteasomalen Promotoren	60
3.1.12 TCF11/Nrf1 regulieren die Transkription der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition	61
3.1.13 TCF11 ist im Vergleich zu Nrf1 der entscheidende Transkriptionsfaktor für die Transkription der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition	64
3.1.14 TCF11 reguliert neben den proteasomalen vermutlich auch andere im UPS involvierte Gene	66
3.2 Lokalisation und Abbau von TCF11 und Nrf1	67
3.2.1 TCF11 und Nrf1 sind ER-ständige Membranproteine	67
3.2.2 Nukleäres TCF11 bzw. Nrf1 ist nicht N-glykosyliert	69
3.2.3 TCF11/Nrf1 werden durch das 26S Proteasom abgebaut, jedoch ohne Beteiligung von Keap1	70
3.2.4 Einfluss der ER-assoziierten Protein Degradation auf den Abbau von TCF11 und Nrf1	72
4 Diskussion	80
4.1 Regulation der proteasomalen Genexpression nach Proteasominhibition	80
4.1.1 Proteasominhibitoren lösen innerhalb der Zelle oxidativen Stress aus	81
4.1.2 Die humanen proteasomalen Promotoren enthalten AREs	81

4.1.3	Alle essentiellen Bindungsstellen der Transkriptionsmaschinerie liegen im PSMB6-Promotor in den ersten 100 Basen stromaufwärts vom Transkriptionsstart	82
4.1.4	Nrf2 und c-Jun sind nicht für die verstärkte Transkription der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition verantwortlich.....	84
4.1.5	TCF11 ist ein starker Aktivator der Transkription proteasomaler Gene.....	86
4.1.6	TCF11 reguliert die Expression der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition	89
4.1.7	Die Transkription der Immuno β -Untereinheiten und die von PA28 α und β ist unabhängig von TCF11.....	91
4.2	Die Modulation der Ubiquitinierungs- bzw. Deubiquitinierungs-maschinerie nach Proteasominhibition und TCF11 Überexpression.....	92
4.3	Lokalisation und Regulation von TCF11 und Nrf1	93
4.4	Die Degradation von TCF11 und Nrf1 erfolgt unter physiologischen Bedingungen durch den ERAD Weg und nicht über einen Keap1 abhängigen Mechanismus	97
5	Literaturverzeichnis	103
	Abkürzungsverzeichnis	119
	Publikationen.....	121
	Danksagung.....	122
	Erklärung.....	123
	Anhang	124

Zusammenfassung

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist das wichtigste System für den Abbau von nicht mehr benötigten oder beschädigten Proteinen innerhalb der eukaryotischen Zelle und ist somit an der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase beteiligt. Ein Abfall der proteasomalen Aktivität führt zu intrazellulärem Stress. Die Zelle wirkt diesem Abfall entgegen, indem sie die proteasomalen Gene verstärkt exprimiert und dadurch die Neubildung von 26S Proteasomen bewirkt. Während in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* mit Rpn4 der Transkriptionsfaktor für die verstärkte Expression identifiziert wurde, ist dieser in Säugetieren noch nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte TCF11 (transcription factor 11) als der verantwortliche Transkriptionsfaktor identifiziert werden, der in der humanen Endothelzelllinie Ea.hy926 die Transkription der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition induziert. Unter physiologischen Bedingungen ist TCF11 ein N-glykosyliertes ER-ständiges Membranprotein, welches durch die ER-assoziierte Protein Degradation, unter der Mitwirkung des E3-Enzyms HRD1 und der AAA⁺-ATPase p97, schnell abgebaut wird. Nach der Proteasominhibition kommt es zur Akkumulation von oxidierten Proteinen, und TCF11 wird aktiviert und über einen noch nicht identifizierten Mechanismus in den Zellkern transportiert. Die Aktivierung von TCF11 erfolgt sehr wahrscheinlich über die regulierte Intramembran-Proteolyse (RIP). Im Zellkern bindet TCF11 mit MafG an ARES (antioxidant response element) in den proteasomalen Promotoren und aktiviert dadurch die Transkription der proteasomalen Gene. Darüber hinaus reguliert TCF11 nicht nur die Expression der proteasomalen Gene, sondern auch die von zahlreichen Enzymen, die die Ubiquitinierung von Proteinen katalysieren. Dadurch wird die zelluläre Homöostase wiederhergestellt und TCF11 sehr wahrscheinlich durch die neu gebildeten Proteasomen abgebaut.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen auf, dass die Integrität des UPS nach Proteasominhibition in der humanen Endothelzelllinie Ea.hy926 über einen TCF11 abhängigen Rückkopplungsmechanismus aufrechterhalten wird.

1 Einleitung

1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Peptidbindungen sind sehr stabil. Sie besitzen unter physiologischen Bedingungen eine Halbwertszeit von mehreren hundert Jahren (Wolfenden and Snider 2001). Daher wurde bis in die 1940er Jahre angenommen, dass Proteine stabile Moleküle innerhalb der Zelle sind. Über die Jahre wurde jedoch deutlich, dass Proteine innerhalb der Zelle nicht statisch sind, sondern, dass ihre Funktionen streng durch deren Synthese, Modifikation und Abbau reguliert werden. Der Großteil der zellulären Proteine wird in einem ATP abhängigen Mechanismus durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut. Die Hauptbestandteile des UPS sind das kleine thermostabile Protein Ubiquitin, zahlreiche Enzyme und das Proteasom. Proteine, die degradiert werden sollen, werden durch eine Enzym Kaskade mit einer Ubiquitinkette verknüpft und somit als zu degradierende Proteine erkennbar gemacht. Diese ubiquitinierten Proteine werden durch das Proteasom erkannt und abgebaut. Da der geregelte Abbau von Proteinen eine enorm wichtige Rolle in der Regulation von zellulären Prozessen einnimmt, ist das UPS in zahlreichen Vorgängen involviert (Abb. 1.1).

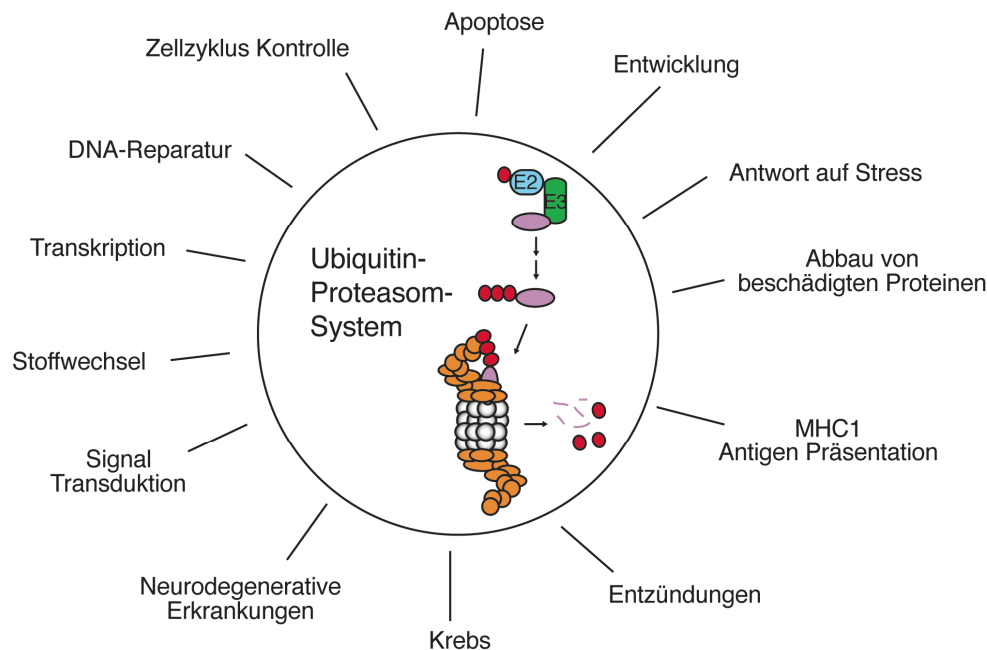


Abb. 1.1: Übersicht zellulärer Prozesse und Erkrankungen in denen das UPS involviert ist (modifiziert nach (Wolf and Hilt 2004))

1.1.1 Ubiquitin

Ubiquitin wurde im Jahre 1974 zum ersten Mal isoliert (Goldstein 1974). Die Annahme, dass Ubiquitin ubiquitinär exprimiert wird und in der B- und T-Zell Differenzierung involviert sein soll, brachte ihm vorerst den Namen „ubiquitous immunopoietic polypeptide“ ein, woraus

später vereinfacht Ubiquitin wurde (Goldstein et al. 1975; Schlesinger and Goldstein 1975). Auch wenn die rein immunologische Funktion schnell widerlegt wurde (Low and Goldstein 1979), konnte aufgrund einer hohen phylogenetischen Konservierung des 76 Aminosäure langen Proteins schon früh auf eine wichtige Funktion innerhalb der Zelle geschlossen werden (Schlesinger and Goldstein 1975; Ciechanover et al. 1980; Ozkaynak et al. 1984). Über die Jahre wurde immer deutlicher, dass Ubiquitin eine der wichtigsten Komponenten im regulierten Abbau von Proteinen ist (Hershko et al. 1980; Wilkinson et al. 1980; Ciechanover et al. 1984; Hough et al. 1986). Ubiquitin wird entweder als Fusionsprotein mit ribosomalen Untereinheiten oder als lineares Polyubiquitin exprimiert (Wiborg et al. 1985; Baker and Board 1987; Ozkaynak et al. 1987) und anschließend durch spezielle Proteasen (deubiquitinierende Enzyme : DUBs) in einzelne Ubiquitinmoleküle gespalten (Reyes-Turcu et al. 2009; Reyes-Turcu and Wilkinson 2009). Die einzelnen Ubiquitinmoleküle werden danach durch eine Enzym-Kaskade in Kettenform auf Proteine übertragen, wodurch diese Proteine für den Abbau markiert werden. Dabei wird die Carboxylgruppe des C-terminalen Gly76 des Ubiquitins mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes des Zielproteins durch eine Isopeptidbindung verknüpft. Innerhalb der Ubiquitinkette sind die einzelnen Ubiquitine ebenfalls durch die gleiche Art und Weise verbunden. Das Ubiquitin besitzt sieben Lysinreste: Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 und Lys63. Dadurch können Ketten entstehen, in denen die einzelnen Ubiquitine über die verschiedenen Lysine miteinander verbunden sind. Während Ubiquitinketten mit über Lys48 verknüpften Ubiquitinen Proteine für den Abbau durch das Proteasom markieren (Chau et al. 1989), sind Ketten mit über Lys63 verbundenen Ubiquitinen primär in nicht-Abbau Prozessen wie der DNA-Reparatur oder in Signalkaskaden involviert oder markieren das Protein für den lysosomalen Abbau (Spence et al. 1995; Deng et al. 2000; Barriere et al. 2007; Panier and Durocher 2009). Die Verbindung von Ubiquitinen über Lys29 und/oder Lys33 soll in der Regulation von einigen Kinasen wichtig sein (Al-Hakim et al. 2008). Jedoch scheint die Unterteilung nicht so strikt zu sein, da in einigen Fällen auch über Lys11, Lys29 oder Lys63 verknüpfte Ubiquitinketten den Abbau durch das 26S Proteasom bewirken (Kim et al. 2007; Jin et al. 2008; Saeki et al. 2009; Xu et al. 2009).

1.1.2 Die Ubiquitinierungskaskade von Proteinen

Die Verknüpfung von Proteinen mit Ubiquitinketten erfolgt durch eine Abfolge von enzymatischen Reaktionen, die durch die Ubiquitin-aktivierenden (E1), -konjugierenden (E2) und -ligierenden (E3) Enzyme katalysiert werden (Abb. 1.2A, (Hershko and Ciechanover 1998)). Das humane Genom codiert für 1 E1-, ca. 40 E2- und mehrere hundert E3-Enzyme (Pickart and Eddins 2004). Der erste Schritt in dieser Ubiquitinierungskaskade ist die ATP abhängige Aktivierung des Ubiquitins. Diese Reaktion erfolgt durch das E1-Enzym.

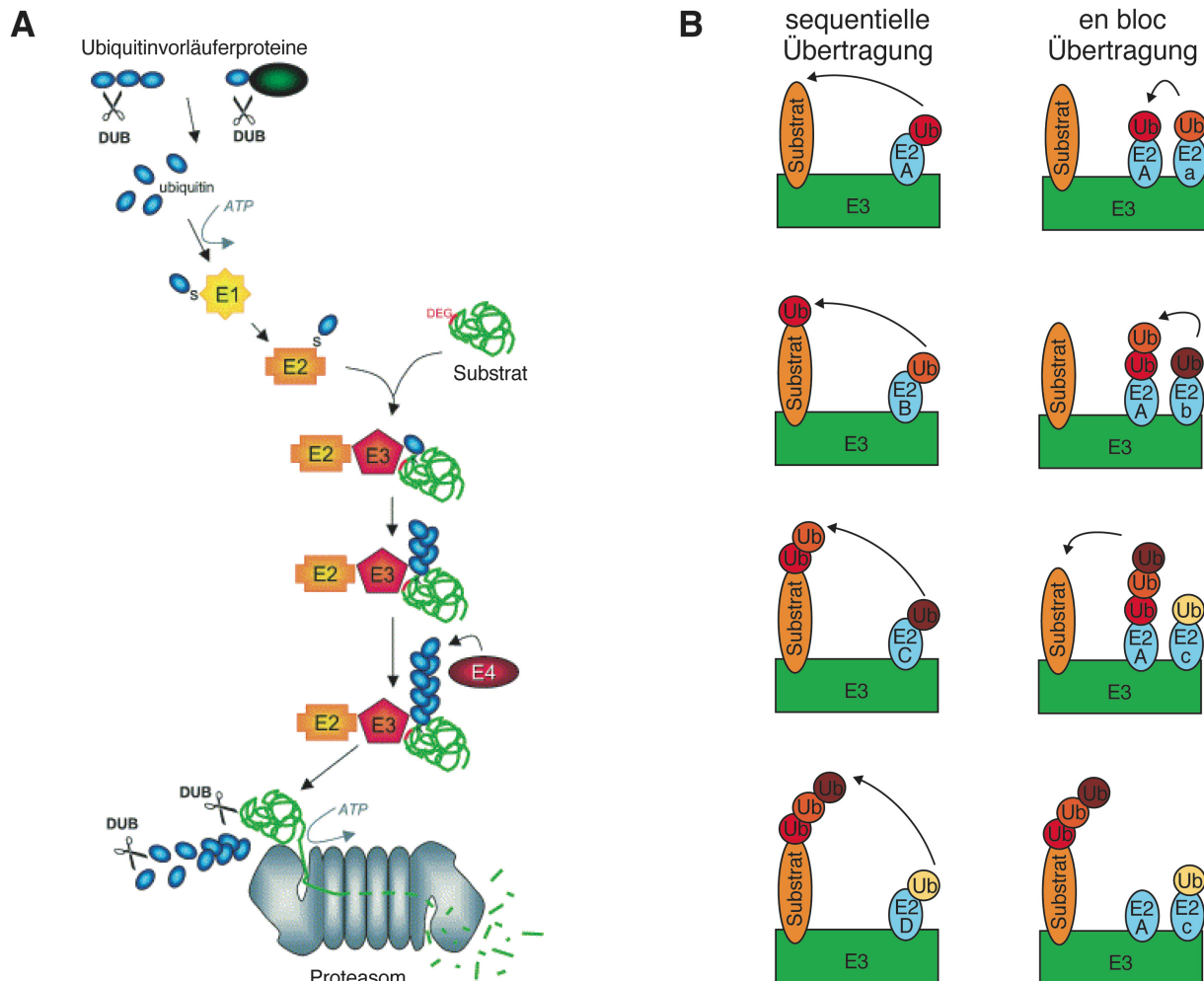


Abb. 1.2: Die Ubiquitinierungskaskade von Proteinen A) Die Ubiquitinierung von Proteinen beginnt mit der Generierung von Monoubiquitin aus Ubiquitinvorläuferproteinen durch deubiquitinierende Enzyme (DUBs). Im nächsten Schritt wird das Monoubiquitin durch eine Thioesterbindung mit dem E1-Enzym aktiviert. Danach überträgt das E1-Enzym das Ubiquitin auf ein Cystein in einem E2-Enzym. Das Substrat mit einem Abbausignal (DEG) wird durch ein E3-Enzym erkannt und durch ein Zusammenspiel von E2- und E3-Enzymen mit dem Ubiquitin an einem seiner Lysine verbunden. Im weiteren Verlauf werden durch die E2- und E3-Enzyme weitere Monoubiquitine an das bereits am Substrat gebundene Ubiquitin angehängt, wodurch eine Ubiquitinkette entsteht. In einigen Fällen wird die Ubiquitinkette durch ein E4-Enzym verlängert. Das polyubiquitinierte Substrat wird durch das 26S Proteasom erkannt, ATP abhängig entfaltet, deubiquitiniert und abgebaut. (modifiziert nach (Lindsten and Dantuma 2003)) B) Bei der sequentiellen Ubiquitinierung von Substraten durch RING-E3-Enzyme kommt es zur schrittweisen Verknüpfung des Ubiquitins mit dem Substrat. Nach jedem Schritt kommt es zur Abdissoziation des E2-Enzyms und zur Bindung eines neuen mit Ubiquitin beladenen E2-Enzyms. Bei der „en bloc“ Übertragung ganzer Ubiquitinketten werden diese zuerst auf dem E2-Enzym zusammengebaut und dann auf das Substrat übertragen. Dabei rekrutiert jedes RING-E3-Enzym zwei E2-Enzyme. Ein E2-Enzym (E2A) bleibt stabil mit dem E3-Enzym verbunden. Auf diesem wird die Ubiquitinkette zusammengebaut. Das andere E2-Enzym (E2a) überträgt sein Ubiquitin auf E2A und dissoziiert vom E3-Enzym ab. Anschließend bindet ein weiteres mit Ubiquitin beladenes E2-Enzym (E2b). Dieses überträgt sein Ubiquitin ebenfalls auf E2A. Diese Schritte wiederholen sich bis die Ubiquitinkette lang genug ist, um mit dem Substrat verknüpft zu werden. (modifiziert nach (Deshaies and Joazeiro 2009))

Dabei entsteht unter der Umsetzung von ATP zu AMP und PP_i eine energiereiche Thioesterbindung zwischen dem Cystein im aktiven Zentrum des E1-Enzyms und dem Carboxyterminus vom Ubiquitin. Das entstandene E1-Ubiquitin-Konjugat weist eine hohe Affinität zu E2-Enzymen auf und vermittelt den Transfer des Ubiquitins auf ein Cystein im

aktiven Zentrum eines E2-Enzyms unter Bildung einer neuen Thioesterbindung. Letztendlich kommt es zur Assoziation vom E2-Enzym mit einem E3-Enzym (Ubiquitin-Ligase) und zur Ausbildung der Isopeptidbindung des Ubiquitins vom E2-Enzym mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes des am E3-Enzym gebundenen Substrats (Hershko et al. 1983). Diese Vorgänge wiederholen sich nun mehrfach, wodurch eine Ubiquitinkette entsteht. Dabei wird die Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Gly76 des distalen und einem Lysinrest des proximalen Ubiquitins geschlossen. Im Jahr 2007 zeigten Li und Mitarbeiter, dass die Ubiquitinkette auch erst komplett am E2-Enzym zusammengebaut werden kann, bevor diese „en bloc“ auf das Substrat übertragen wird (Abb. 1.2B, (Li et al. 2007)). Die Spezifität für das Substrat wird durch die verschiedenen E2- und E3-Enzyme hergestellt. In einigen Fällen bedarf es für die Verlängerung der Ubiquitinkette eines weiteren Enzyms, welches als E4-Enzym bezeichnet wird. Dieses Enzym erkennt polyubiquitinierte Proteine und verlängert unter Mitwirkung von E1-, E2- und E3-Enzymen die bestehende Ubiquitinkette.

1.1.3 E3-Enzyme (Ubiquitin-Ligasen)

Das menschliche Genom codiert für mehrere hundert E3-Ubiquitinligasen, welche die Substraterkennung, die Rekrutierung des E2-Enzyms und den Transfer des Ubiquitins vom E2-Enzym auf das Substrat vermitteln. Basierend auf ihrem Katalysemechanismus kann man die E3-Enzyme in zwei Klassen aufteilen: Die HECT- (homologous to E6-AP carboxyl terminus) Domänen und die RING- (really interesting new gene) bzw. U-Box- (UFD2 homology) Domänen E3-Enzyme (Huibregtse et al. 1995; Coscoy et al. 2001; Hatakeyama et al. 2001; Deshaies and Joazeiro 2009). Die HECT-E3-Enzyme besitzen ein Cystein, auf das Ubiquitin vom E2-Enzym übertragen wird. Dadurch entsteht eine Thioesterbindung zwischen dem Ubiquitin und dem HECT-E3-Enzym. Anschließend wird das Ubiquitin an ein Lysinrest im Substrat gebunden (Abb. 1.3A, (Rotin and Kumar 2009)). Die RING-Domäne von RING-E3-Enzymen enthält viele Cystein- und Histidinreste, die jedoch nicht für die Bindung von Ubiquitin wichtig sind, sondern für die Koordination zweier Zinkionen. Durch diese Koordination wird die globuläre Struktur der RING-Domäne aufrechterhalten, was für die Bindung des E2-Enzyms wichtig ist (Deshaies and Joazeiro 2009). Nachdem das E2-Enzym über die RING-Domäne gebunden wurde, überträgt es das an sich gebundene Ubiquitin direkt auf ein Lysinrest im Substrat, welches ebenfalls am E3-Enzym gebunden ist (Abb. 1.3A). Somit fungieren RING-E3-Enzyme nur als Gerüst, damit E2-Enzym und Substrat in engen Kontakt gelangen können. Man unterscheidet die RING-E3-Enzyme noch dadurch, ob sich die Substraterkennungs- und RING-Domäne in einem Protein befinden, oder auf verschiedene Proteine verteilt sind. Ein E3-Enzym, das nur aus einem Protein besteht und somit die Substraterkennungs- und die RING-Domäne enthält, ist HRD1 (3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A reductase degradation protein 1) (Abb. 1.3A).

Multiprotein RING-E3-Enzyme sind z.B. die Cullin3 Ubiquitinligase-Komplexe. Diese bestehen aus dem Protein Cullin3, dem RING-E3-Enzym Rbx1 (RING-box protein 1) und einem der verschiedenen BTB- (broad complex/tramtrack/bric-a-brac) Proteine (Abb. 1.3B, (van den Heuvel 2004)). Die U-Box-E3-Enzyme vermitteln so wie RING-E3-Enzyme nur die Interaktion von E2-Enzym und Substrat, indem sie das E2-Enzym und das Substrat gleichzeitig binden (Hatakeyama et al. 2001). Die RING-Domäne und die U-Box-Domäne besitzen strukturelle Ähnlichkeiten (Aravind and Koonin 2000), jedoch wird die Struktur der U-Box-Domäne nicht durch die Koordination von Metallionen, sondern durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren der Domäne aufrechterhalten (Ohi et al. 2003).

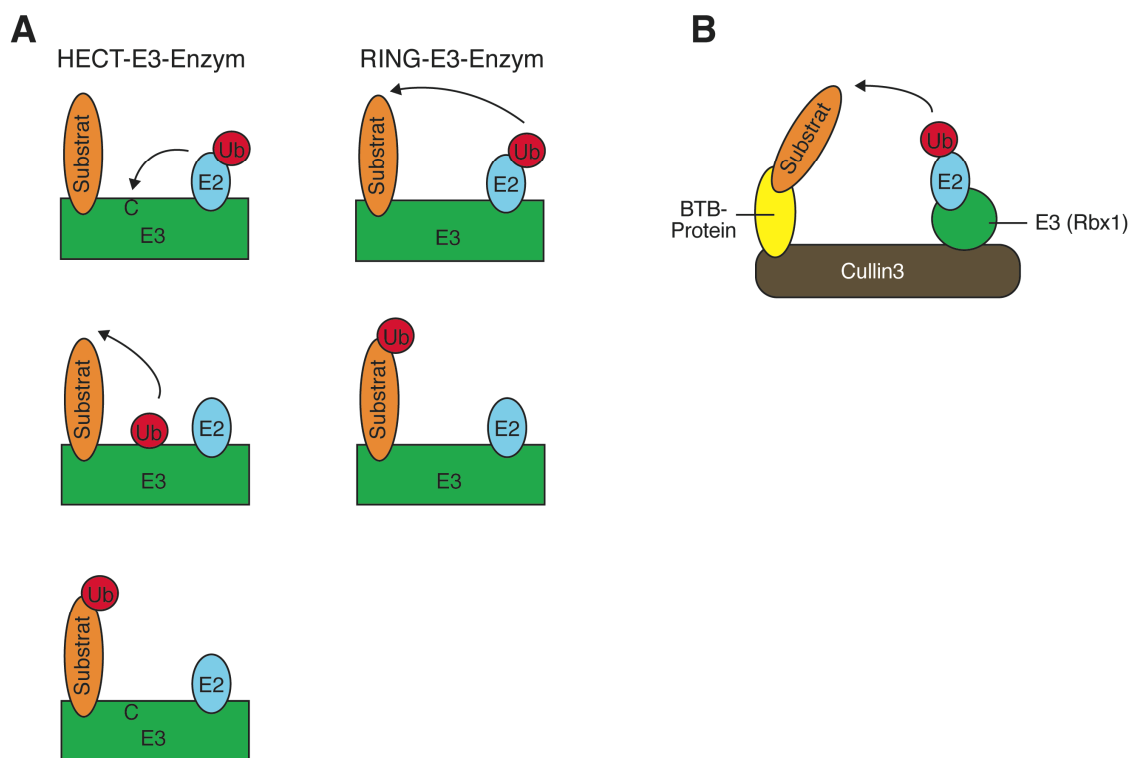


Abb. 1.3: Katalysiemechanismus von HECT- und RING-E3-Enzymen A) HECT-E3-Enzyme besitzen ein konserviertes Cystein (C) mit welchem das E2-Enzym das Ubiquitin verknüpft. Anschließend überträgt das E3-Enzym das Ubiquitin auf das Substrat. RING-E3-Enzyme vermitteln den direkten Transfer des Ubiquitins vom E2-Enzym auf das Substrat. B) Viele RING-E3-Enzyme sind Bestandteile multimerer Proteinkomplexe. Beispiele sind die Cullin3 Ubiquitinligase-Komplexe. Diese bestehen aus Cullin3, einem BTB-Protein und dem RING-E3-Enzym Rbx1. Die RING-Domäne in Rbx1 vermittelt die Bindung des E2-Enzyms, welches das am BTB-Protein gebundene Substrat ubiquitiniert. (modifiziert nach (Deshaies and Joazeiro 2009))

1.1.4 Die ER-assoziierte Protein Degradation (ERAD)

Sekretorische oder ER-ständige Proteine werden in einem ungefalteten Zustand durch den trimeren Sec61 ($\text{Sec61}\alpha\beta\gamma$) Komplex kotranslational in die ER-Membran eingeführt oder in das ER-Lumen transportiert (Matlack et al. 1998). Im ER wird die Mehrzahl der Proteine N-glykosyliert und durch die Unterstützung von Chaperonen (GRP78, GRP94, PDI) und

Lektinen (Calnexin, Calretikulin (Helenius and Aebi 2004)) in die korrekte Konformation gebracht. Ist die Proteinfaltung der Glykoproteine korrekt, werden diese zu ihrem Bestimmungsort transportiert. Während des Vorgangs der Proteinfaltung können jedoch Fehler auftreten, die dazu führen, dass die Proteine nicht ihre optimale Konformation erlangen. Unter Mitwirkung der Lektine Calnexin und Calretikulin wird versucht, diese Proteine in ihre korrekte Konformation zubringen (Caramelo and Parodi 2008). Wenn nach mehrmaligem Durchlaufen dieses Zyklus, die Proteine nicht ihre korrekte Konformation erlangen, werden diese ubiquitiniert und abgebaut. Da sowohl die Ubiquitinierung als auch der Abbau von ERAD Substraten im Cytosol stattfinden, müssen die Proteine vom ER in dieses Zellkompartiment gelangen. Allerdings können Proteine die hydrophobe Lipiddoppelschicht nicht allein passieren. Daher wird vermutet, dass diese Aufgabe von einem Retrotranslokationskanal übernommen wird (Abb. 1.4). Die Zusammensetzung dieses Kanals wird jedoch kontrovers diskutiert. Ursprünglich wurde vermutet, dass der Sec61 Komplex auch die Retrotranslokation vermittelt (Wiertz et al. 1996; Pilon et al. 1997; Schafer and Wolf 2009). Jedoch werden auch die Proteine Derlin1-3 für die Retrotranslokation verantwortlich gemacht (Lilley and Ploegh 2004; Ye et al. 2004; Oda et al. 2006). Die Derlin Proteine formen mit dem membranständigen E3-Enzym HRD1 und weiteren Proteinen große Proteinkomplexe (Lilley and Ploegh 2005; Schulze et al. 2005). Zu den assoziierten Proteinen gehören z.B. die Proteine SEL1L (suppressor of lin-12-like protein 1), AUP1 (ancient ubiquitous protein 1), HERP (homocysteine inducible ER protein) und VIMP (valosin-containing protein-interacting membrane protein) (Ye et al. 2004; Schulze et al. 2005; Mueller et al. 2008). In diesen großen Proteinkomplexen könnte die Retrotranslokation auch auf mehrere Proteine aufgeteilt sein. Neben dem RING-E3-Enzym HRD1 gibt es im ERAD noch weitere membrangebundene RING-E3-Ubiquitinligasen: gp78, TEB4 und RMA1 (RING-finger protein with membrane anchor 1) (Fang et al. 2001; Hassink et al. 2005; Younger et al. 2006). Diese vermitteln mit assoziierten E2-Enzymen die Ubiquitinierung der Substrate auf der cytosolischen Seite der ER-Membran (Abb 1.4). Neben der Funktion als Signal für den Abbau durch das Proteasom dient die Ubiquitinierung auch zur Bindung der hexameren AAA^+ -ATPase p97/VCP (VCP : valosin containing protein), die mit ihren Kofaktoren UFD1 (ubiquitin fusion degradation protein 1) und NPL4 (nuclear protein localization protein 4 homolog) für die Retrotranslokation der meisten Substrate in das Cytosol absolut notwendig ist (Ye et al. 2001). Dabei wird vermutet, dass der p97-UFD1-NPL4 Komplex unter ATP Hydrolyse die Substrate aus dem Retrotranslokationskanal heraus zieht (Ye et al. 2003). Die Rekrutierung des p97-UFD1-NPL4 Komplexes an die ER-Membran erfolgt durch das Protein VIMP oder durch Proteine mit einer UBX- (ubiquitin regulator X) Domäne, wie UBXD2 (Ye et al. 2004; Liang et al. 2006). Da p97 mit dem 26S Proteasom interagieren kann (Dai et al. 1998; Ikeda et al. 2009), ist der p97-UFD1-NPL4

Komplex sehr wahrscheinlich in der Lage, ubiquitinierte Substrate direkt an das 26S Proteasom zu übertragen (Abb. 1.4). Jedoch kann dies auch durch weitere Proteine übernommen werden (Medicherla et al. 2004).

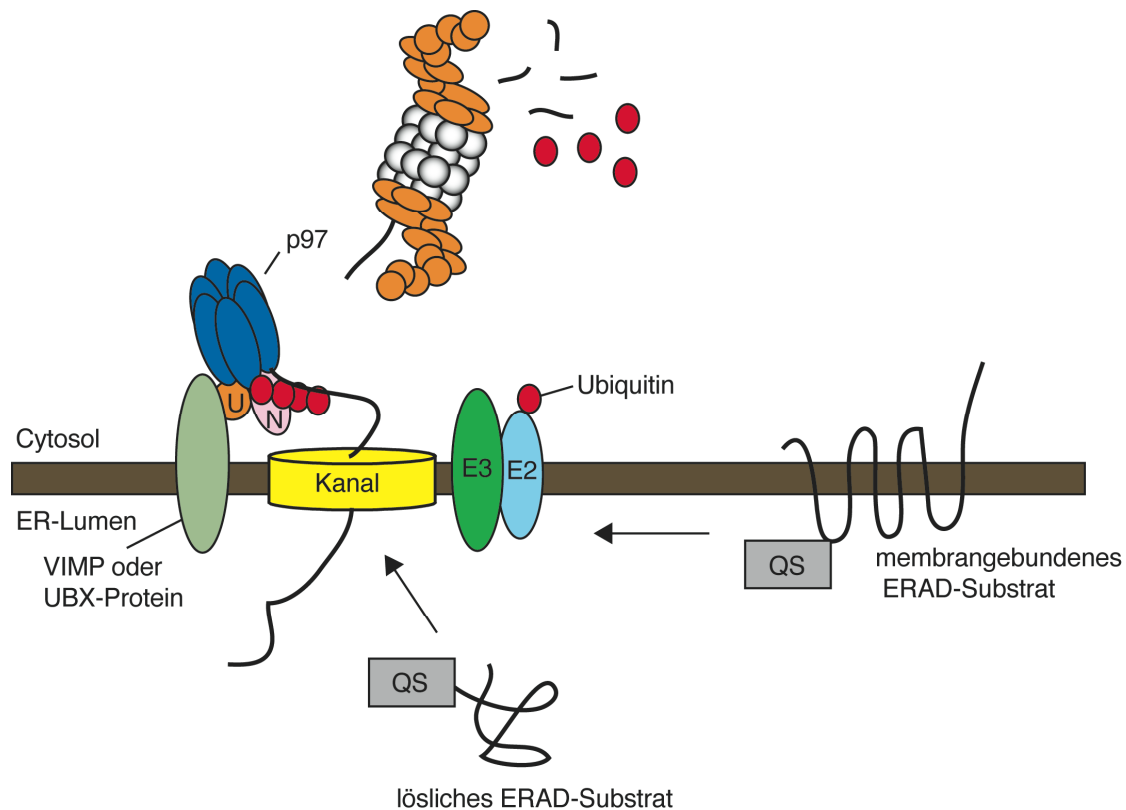


Abb. 1.4: ER-assoziierte Protein Degradation (ERAD) Molekulare Chaperone und Komponenten des Qualitätskontroll-Systems (QS), wie die ER-Mannosidase 1 (ERMan1), PDI, SEL1L oder EDEM 1-3 erkennen fehlgefaltete Proteine und rekrutieren sie zu einem der E3-Enzymkomplexe an der ER-Membran. Nach der teilweisen Retrotranslokation durch den Retrotranslokationskanal ins Cytosol, wird das Substrat durch das E3-Enzym ubiquitiniert. Alle E3-Enzymkomplexe bestehen aus einem zentralen RING-E3-Enzym, E2-Enzymen und weiteren Komponenten, wie z.B. VIMP oder UBX-Proteinen, die den Proteinkomplex p97-UFD1(U)-NPL4(N) an die ER-Membran rekrutieren. Der Proteinkomplex p97-UFD1-NPL4 extrahiert das ubiquitinierte Substrat ATP abhängig endgültig ins Cytosol und vermittelt den Kontakt des Substrats mit dem 26S Proteasom und somit dessen Abbau.

Die ER-assoziierte Protein Degradation ist nicht nur für den Abbau von fehlgefalteten glykosylierten bzw. nicht glykosylierten Proteinen zuständig, sondern sorgt auch für den regulierten Abbau des ER-ständigen Enzyms HMGCoA Reduktase (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A) oder des Transkriptionsfaktors SREBP (sterol regulatory element-binding protein) (Song et al. 2005; Hughes et al. 2009).

1.1.5 Aufbau des 20S Proteasoms

Das 20S Proteasom besitzt die Struktur eines Zylinders und besteht aus vier heptameren Ringen. In Eukaryoten enthalten die beiden äußeren Ringe 7 verschiedene, aber homologe α -Untereinheiten ($\alpha 1$ - $\alpha 7$), die den Zugang zur katalytischen Kammer im Inneren des 20S Proteasoms kontrollieren und mit regulatorischen Faktoren und Komplexen interagieren

(Groll et al. 1997). Ebenso wie die äußeren Ringe bestehen die beiden inneren Ringe aus 7 Untereinheiten, den β -Untereinheiten (β_1 - β_7), von denen β_1 , β_2 und β_5 die proteolytische Aktivität des 20S Proteasoms ausmachen. In Säugetierzellen gibt es neben den Standard- β_1 -, β_2 - und β_5 -Untereinheiten die Immuno- β_{1i} -, β_{2i} - und β_{5i} -Untereinheiten, die z.B. als Antwort auf Interferon- γ vermehrt exprimiert werden und anstelle der Standard β -Untereinheiten in das 20S Proteasom eingebaut werden (Abb. 1.5, (Kelly et al. 1991; Groettrup et al. 1996a; Klotzel 2004)).

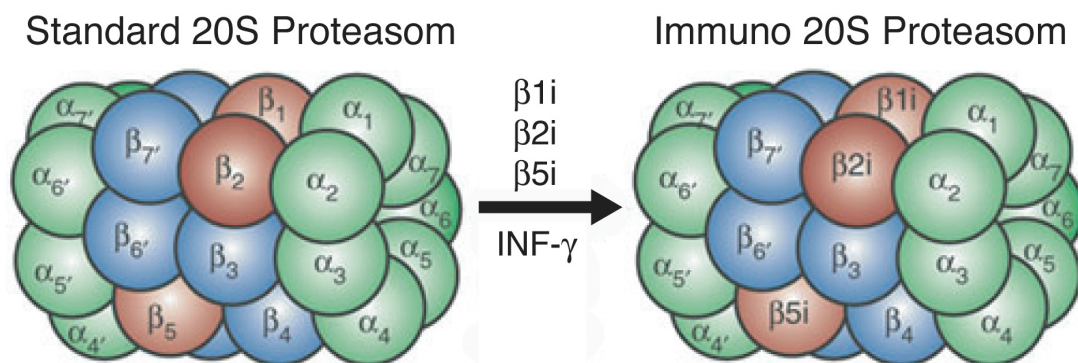


Abb. 1.5: Aufbau des Standard- bzw. Immuno 20S Proteasoms Das Standard 20S Proteasom besteht aus insgesamt 28 Untereinheiten. Die beiden äußeren Ringe sind jeweils aus sieben α - und die beiden inneren Ringe aus sieben β -Untereinheiten aufgebaut. Die katalytischen β -Untereinheiten (β_1 , β_2 und β_5) sind rot dargestellt. Diese werden nach einem proinflammatorischen Stimulus (z.B. Interferon- γ) in neu assemblierenden 20S Proteasomen durch die induzierbaren Immuno β -Untereinheiten β_{1i} , β_{2i} und β_{5i} ersetzt, wodurch das Immuno 20S Proteasom entsteht. (modifiziert nach (Klotzel 2004))

Zusammen bilden die beiden α - und β -Ringe zwei Vorkammern, welche die Substrate passieren müssen, um zum katalytischen Zentrum zu gelangen, das im Inneren des Proteasoms liegt. Der zentrale Eingang, der durch die α -Untereinheiten gebildet wird, ist normalerweise durch die N-Termini der 7 α -Untereinheiten verschlossen. Dadurch ist das Proteasom proteolytisch inaktiv (Groll et al. 1997; Groll et al. 2000a; Unno et al. 2002). Eine Deletion des N-Terminus oder eine Mutation von Asp 9 in α_3 führt zu einer Öffnung des Eingangs und somit zu einem erleichterten Zugang des Substrats zum katalytischen Zentrum. Dieser Vorgang wird normalerweise von den ATPasen des 19S Regulatorkomplexes durchgeführt. Das Öffnen des Kanals wird „gating“ genannt. Damit das Substrat dem proteolytischen Zentrum zugeführt werden kann, muss es vollständig entfaltet sein (Groll et al. 1997). Dieses Entfalten übernimmt normalerweise ebenfalls der 19S Regulatorkomplex.

Wegen seines spezifischen Katalysemechanismus zählt das Proteasom zur Familie der N-terminalen Hydrolasen, da die proteolytisch aktiven β -Untereinheiten β_1 , β_2 und β_5 ein N-terminales Threonin besitzen, welches in die proteolytische Kammer ragt und als Nukleophil die Peptidbindung angreift (Brannigan et al. 1995; Lowe et al. 1995; Schmidtke et al. 1996).

Die 3 aktiven Zentren innerhalb eines β -Ringes unterscheiden sich in ihren proteolytischen Eigenschaften. Es gibt Chymotrypsin-ähnliche ($\beta 5$), Trypsin-ähnliche ($\beta 2$) oder Kaspase-ähnliche ($\beta 1$) Aktivitäten (Dahlmann et al. 1986; Cardozo 1993).

1.1.6 Biogenese des 20S Proteasoms

In Säugetierzellen ist die Proteasombiogenese (Abb. 1.6) ein hoch geordneter Prozess, der die Biosynthese von allen Untereinheiten, ihre Zusammenlagerung und Reifung beinhaltet. Der erste Schritt ist die Herstellung der sieben verschiedenen α -Untereinheiten und der sieben β -Untereinheiten des 20S Proteasoms. Die β -Untereinheiten $\beta 1,2,5,6$ und $\beta 7$ werden zunächst mit einer N-terminalen Verlängerung synthetisiert (Proform). Darauf erfolgt die Assemblierung der Untereinheiten zum fertigen Proteasom. Diese beginnt mit der Bildung eines heptameren Ringes aus den sieben α -Untereinheiten. Die Bildung dieses α -Ringes wird durch die beiden Heterodimere, die aus den Proteinen PAC1 und PAC2 (proteasome assembly chaperone) sowie PAC3 und PAC4 bestehen, unterstützt (Hirano et al. 2005; Hirano et al. 2006; Le Tallec et al. 2007). Während das Dimer aus PAC1/PAC2 am α -Ring bis zur Fertigstellung des 20S Proteasoms gebunden bleibt und schließlich durch dieses degradiert wird, dissoziiert das Dimer aus PAC3/PAC4 während der Anlagerung der β -Untereinheiten vom α -Ring ab. Der α -Ring dient als Matrix für die Anlagerung der β -Untereinheiten. Dieser Vorgang wird durch das Protein POMP (proteasome maturation protein) reguliert (Burri et al. 2000; Witt et al. 2000). In Säugetierzellen beginnt die Assemblierung des β -Ringes mit der Bindung von POMP und $\beta 2$ an den α -Ring (Fricke et al. 2007; Hirano et al. 2008). Anschließend binden die restlichen β -Untereinheiten in einer bestimmten Reihenfolge bis ein Halbproteasom, bestehend aus einem kompletten α - und β -Ring, entsteht. (Frentzel et al. 1994; Nandi et al. 1997; Heink et al. 2005; Hirano et al. 2008). Zwei Halbproteasomen bilden ein großes und möglicherweise kurzlebiges Intermediat, in dem die letzten Reifungsprozesse stattfinden. Diese beinhalten die Prozessierung der Propeptide durch Autokatalyse. Dadurch erfolgt die Aktivierung der proteolytisch aktiven β -Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$. Die Prozessierung findet während der letzten Schritte der Proteasombiogenese statt. Dadurch wird gewährleistet, dass unreife Proteasomen noch nicht proteolytisch aktiv sind (Schmidtke et al. 1996; Kruger et al. 2001). Nach der Prozessierung kommt es zum Abbau von POMP und dem Dimer PAC1/PAC2 durch das neue assemblierte 20S Proteasom (Ramos et al. 1998; Witt et al. 2000; Hirano et al. 2005; Hirano et al. 2008). Im Jahr 2007 zeigten Fricke und Mitarbeiter, dass die Biogenese des 20S Proteasoms an der äußeren ER-Membran stattfindet (Fricke et al. 2007). Die Interaktion mit der ER-Membran wird dabei durch POMP vermittelt.

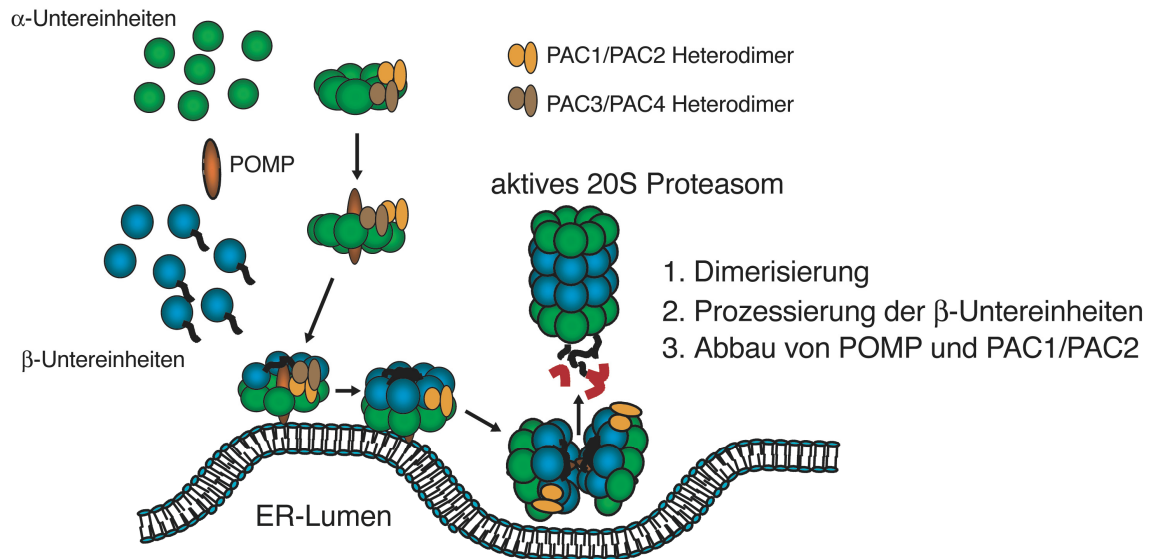


Abb. 1.6: Assemblierung des 20S Proteasoms in Säugerzellen Die Assemblierung des 20S Proteasoms beginnt mit der Bildung eines heptameren α -Ringes. Dieser Vorgang wird durch die beiden Chaperondimere PAC1/2 und PAC3/4 unterstützt. Anschließend vermittelt das Protein POMP die Interaktion des α -Ringes mit der äußeren ER-Membran und die schrittweise Anlagerung der β -Untereinheiten. Einige β -Untereinheiten besitzen Propeptide, die wichtige Funktionen während der Assemblierung ausüben (in schwarz dargestellt). Am Ende kommt es zur Dimerisierung zweier Halbproteasomen und zur Prozessierung der Propeptide durch Autokatalyse. Dadurch werden die proteolytisch aktiven β -Untereinheiten aktiviert, und das neu assemblierte 20S Proteasom degradiert POMP und das Dimer PAC1/PAC2. (modifiziert nach (Fricke et al. 2007))

1.1.7 Regulatorkomplexe des 20S Proteasoms

Das 20S Proteasom besitzt innerhalb der Zelle keine proteolytische Aktivität, da der Zugang zum innen liegenden aktiven Zentrum durch die α -Untereinheiten verschlossen ist (Groll et al. 2000a). Dies schützt die Zelle vor unkontrollierter Proteolyse durch das 20S Proteasom. Die Aktivität des 20S Proteasoms wird durch Proteinkomplexe reguliert. Durch die Bindung dieser Proteinkomplexe an die α -Ringe kommt es zu einer Umlagerung der α -Untereinheiten, wodurch der zentrale Kanal geöffnet und der Zugang des Substrats zum aktiven Zentrum ermöglicht wird. Bisher wurden drei verschiedene Proteasomaktivatoren beschrieben: der PA28 $\alpha\beta$ -, der PA28 γ - und der 19S Regulatorkomplex (Marques et al. 2009). Während die Aktivierung des 20S Proteasoms durch den 19S Regulatorkomplex ATP- und Ubiquitin abhängig erfolgt, aktivieren die Regulatorkomplexe PA28 $\alpha\beta$ und PA28 γ das 20S Proteasom ATP- und Ubiquitin unabhängig (Abb. 1.7).

ATP und Ubiquitin abhängig

ATP und Ubiquitin unabhängig

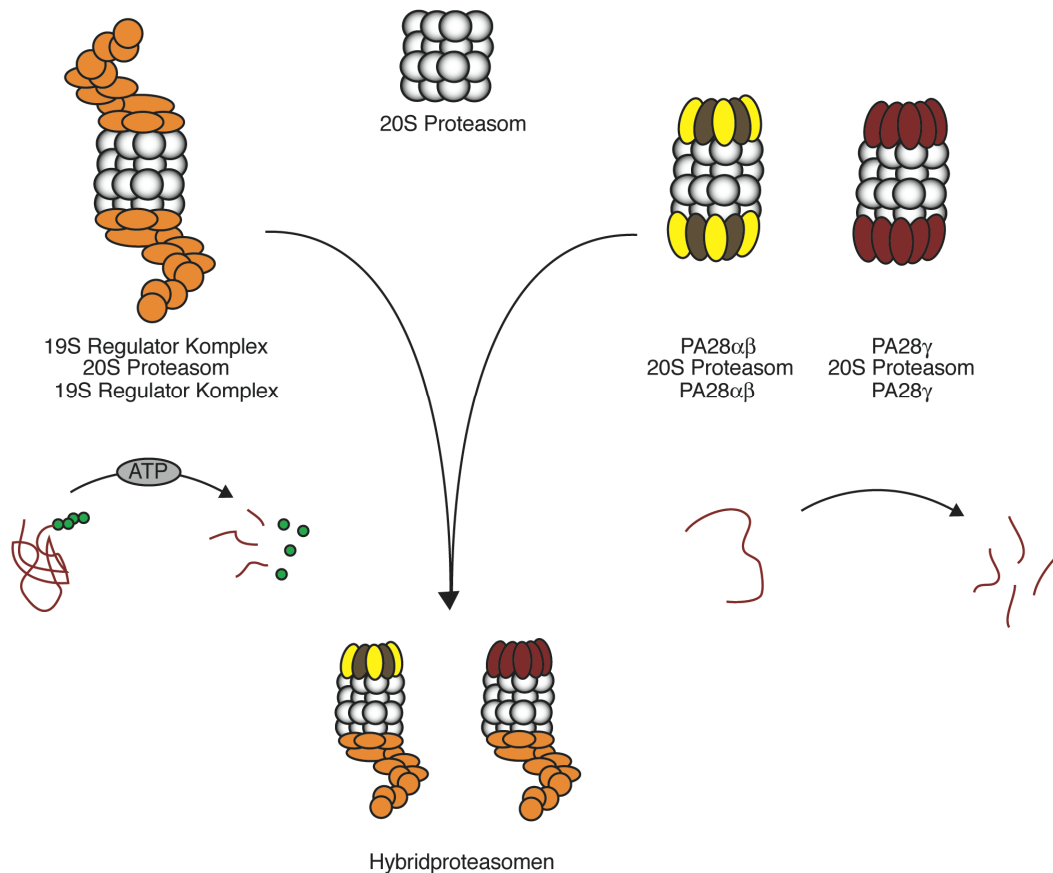


Abb. 1.7: Übersicht der Regulatorkomplexe des 20S Proteasoms Die Regulatorkomplexe des 20S Proteasoms können in zwei Gruppen unterteilt werden: Die einen erkennen ubiquitinierte, native Proteine und nutzen ATP um diese zu entfalten. Die andere Gruppe führt zur ATP unabhängigen Degradation von unstrukturierten und nicht-ubiquitinierten Proteinen. Gemeinsam haben die Regulatoren aus beiden Gruppen die Fähigkeit, durch Assoziationen mit dem 20S Proteasom, zur Öffnung des zentralen Kanals im 20S Proteasom zuzuführen. Ausserdem gibt es auch ein Zusammenspiel der Regulatoren aus beiden Gruppen durch die Bildung von Hybridproteasomen. (modifiziert nach (Mao et al. 2008))

1.1.8 Der 19S Regulatorkomplex (PA700)

Der 19S Regulatorkomplex besteht aus etwa 20 Untereinheiten, die sich in zwei Subkomplexe gliedern (Glickman et al. 1998a; Glickman et al. 1998b; Ferrell et al. 2000). Der Base-Subkomplex, der an die beiden äußeren α -Ringe des 20S Proteasoms bindet, setzt sich aus 6 verschiedenen ATPasen der AAA⁺ Familie (Rpt1-6), die einen hexameren Ring bilden (Fu et al. 2001; Hartmann-Petersen et al. 2001) und vier weiteren nicht-ATPasen (Rpn1, Rpn2, Rpn10, Rpn13) zusammen (Abb. 1.8B). Dieser ist nicht nur für die ATP-abhängige Öffnung des zentralen Eingangs und somit für die Aktivierung des 20S Proteasoms verantwortlich (Glickman et al. 1999), sondern auch für die Erkennung der ubiquitinierten Substratproteine (erfolgt durch Rpn10 (Deveraux et al. 1995) und Rpn13 (Husnjak et al. 2008)) und deren Entfaltung (Liu et al. 2006). Der Lid-Subkomplex ist der obere Teil des 19S Regulatorkomplexes, der nicht direkt mit dem 20S Proteasom in Kontakt

tritt. Dieser besteht aus mindestens 9 nicht-ATPasen und ist für den Abbau und das Recycling von Ubiquitinketten verantwortlich (Abb. 1.8B). Dies übernimmt zum größten Teil die nicht-ATPase Rpn11 (Verma et al. 2002).

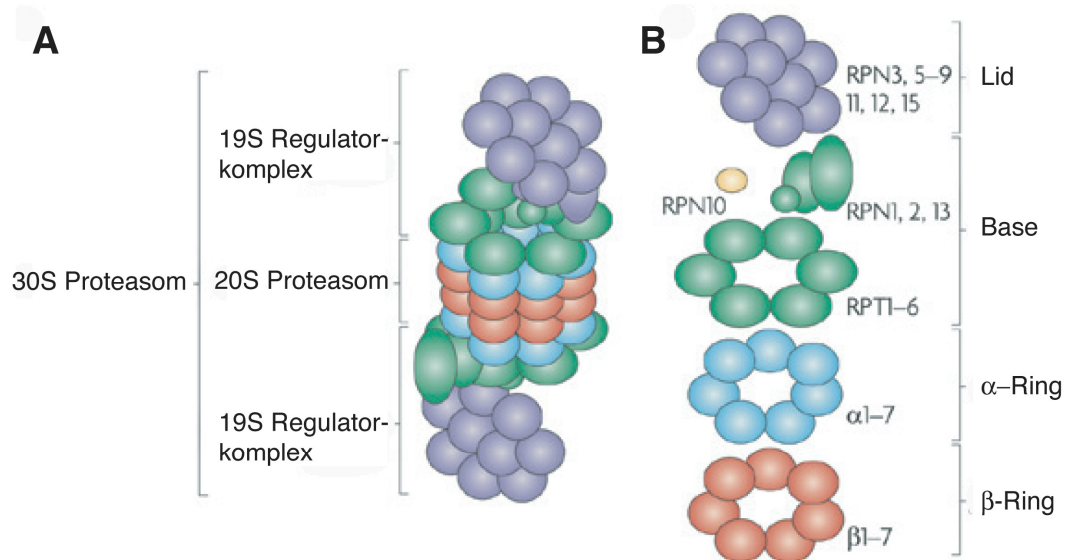


Abb. 1.8: Aufbau des 30S Proteasoms und des 19S Regulatorkomplexes A) Das 30S Proteasom setzt sich aus zwei 19S Regulatorkomplexen und dem 20S Proteasom zusammen. B) Der 19S Regulatorkomplex ist aufgeteilt in Base- und Lid-Subkomplexe. Der Base-Subkomplex wird gebildet von 6 ATPasen der AAA⁺-Familie (RPT1-6) und vier nicht-ATPasen (RPN1, 2, 10, 13). Hingegen besteht der Lid-Subkomplex aus 9 nicht-ATPasen. Rpn10 ist in gelb dargestellt, weil diese Untereinheit nicht eindeutig dem Base-Subkomplex zugeordnet werden kann. (modifiziert nach (Murata et al. 2009))

Die Assemblierung des 19S Regulatorkomplexes wird wie die des 20S Proteasoms durch Chaperone unterstützt (Funakoshi et al. 2009; Kaneko et al. 2009; Le Tallec et al. 2009; Roelofs et al. 2009). Abhängig davon, ob das 20S Proteasom mit einem oder zwei 19S Regulatorkomplexen assoziiert ist, spricht man vom 26S bzw. 30S Proteasom (Abb. 1.8A).

1.1.9 Das Hybridproteasom

Das Hybridproteasom besteht aus einem 20S Proteasom, das auf der einen Seite mit einem 19S Regulatorkomplex und auf der anderen Seite mit einem der anderen Proteasomaktivatoren assoziiert ist (Hendil et al. 1998). Das Hybridproteasom PA28 $\alpha\beta$ -20S-19S ist aktiver als das 26S Proteasom allein und generiert ein Peptidmuster, das sich von dem des 26 Proteasom unterscheidet (Cascio et al. 2002). Die Länge der Peptide ist jedoch unverändert (Kopp et al. 2001). Nach Interferon- γ Behandlung kommt es zu einer verstärkten Expression von PA28 $\alpha\beta$. Dies erhöht die Menge vom PA28 $\alpha\beta$ -20S-19S Hybridproteasom in HeLa Zellen (Tanahashi et al. 2000). Daraus wird geschlossen, dass das PA28 $\alpha\beta$ -20S-19S Hybridproteasom verbessert Antigene generieren kann und somit in der Immunantwort involviert ist.

1.1.10 Proteasominhibitoren

Das Proteasom wird innerhalb der Zelle nicht nur positiv, sondern auch negativ reguliert. So z.B. bindet das Arginin und Prolin reiche antibakterielle Peptid PR39 an die $\alpha 7$ -Untereinheit von 26S Proteasomen und verhindert dadurch selektiv die Degradation von I kappa B α (Gao et al. 2000). Die Gesamtproteasomaktivität bleibt jedoch unverändert. Das Peptid PR39 entsteht durch die Spaltung eines Vorläuferproteins, das von Makrophagen sezerniert wird (Gudmundsson et al. 1995). Ein weiterer intrazellulärer negativer Regulator könnte das Protein PI31 sein, da der ebenfalls Arginin und Prolin reiche C-terminus dieses Proteins das 20S Proteasom *in vitro* inhibiert (Zaiss et al. 1999). Neben den zellulären negativ Regulationsmechanismen gibt es zahlreiche chemische Proteasominhibitoren. Diese lösen ab bestimmten Konzentrationen die Apoptose aus (Meiners et al. 2006). Auf Grund einer erhöhten Sensitivität von Krebszellen gegenüber Proteasominhibitoren (Hideshima et al. 2001), werden diese z.B. zur Behandlung vom multiplen Myelom eingesetzt (Curran and McKeage 2009; Raab et al. 2009). Die chemischen Proteasominhibitoren können in zwei Klassen unterteilt werden: die synthetischen Substratanaloga und die Naturprodukte. Zur Klasse der synthetischen Substratanaloga gehört der membrangängige Peptidaldehydinh inhibitor MG132 (Carbobenzoxym-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal) (Rock et al. 1994), der mit Substraten um die Bindung an die Threonine der aktiven β -Untereinheiten, besonders mit dem Threonin der $\beta 5$ -Untereinheit, konkurriert. MG132 bildet mit dem Threonin ein Halbacetal, welches unter physiologischen Bedingungen reversibel ist. MG132 ist ein relativ potenter Proteasominhibitor mit einem $K_i = 4$ nM. Allerdings ist MG132 nicht besonders spezifisch, da er aufgrund seiner reaktiven Aldehydgruppe auch an andere Proteasen binden kann. Diese Bindungen haben jedoch einen höheren K_i -Wert. Während MG132 zum größten Teil nur die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms hemmt, inhibiert der zu MG132 ähnliche Inhibitor BSc2118 alle drei Aktivitäten (Braun et al. 2005). Ein Proteasominhibitor aus der Klasse der Naturprodukte ist das α',β' -Epoxyketon Epoxomicin, welches von Aktinomyzeten produziert wird (Hanada et al. 1992). Epoxomicin ist membrangängig und inhibiert irreversibel alle drei Aktivitäten des 20S Proteasoms über die Ausbildung eines Morpholinrings mit dem N-terminalen Threonin der $\beta 5$ -Untereinheit (Groll et al. 2000b). Im Gegensatz zu MG132 ist Epoxomicin hochspezifisch für das 20S Proteasom. Der von dem Bakterium *Streptomyces lactacystinaeus* gebildete Proteasominhibitor clasto-Lactacystin gehört ebenfalls zur Klasse der Naturprodukte und inhibiert so wie Epoxomicin alle drei Proteasomaktivitäten irreversibel (Dick et al. 1996).

1.1.11 Transkription der proteasomalen Gene

Der erste Schritt in der Proteasombiogenese ist die Expression aller Untereinheiten. Ein erster Hinweis für eine koordinierte eukaryotische Genexpression proteasomaler Gene

stammt aus Berichten über die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Es wurde ein gemeinsames cis-Element in den Promotoren der proteasomalen Untereinheiten gefunden, das so genannte PACE-Element (proteasome associated control element) (Mannhaupt et al. 1999). Das Protein Rpn4 wird als der Transkriptionsfaktor angesehen, der das PACE-Element erkennt und so die proteasomale Genexpression aktiviert (Mannhaupt et al. 1999). Rpn4 ist ein sehr kurzlebiges Protein, das vom 26S Proteasom abgebaut wird. Wenn in der Zelle eine gewisse Menge an neu gebildetem Proteasom zur Verfügung steht, wird Rpn4 als proteasomales Substrat degradiert. Dieser regulatorische Mechanismus führt zu einem negativen Rückkopplungszyklus, in dem das Protein, das die proteasomale Biogenese induziert, durch die neu assemblierten und gereiften 26S Proteasomen in Hefe degradiert wird (Xie and Varshavsky 2001). Eine Inhibition des Proteasoms führt zu einer verstärkten Expression proteasomaler Gene, die in Hefe durch Rpn4 induziert wird. Diese Ergebnisse bestätigen, dass Rpn4 der Hauptregulator ist, welcher die Proteasominhibition in der Hefe-Zelle kompensiert (Fleming et al. 2002).

Im Jahr 2003 fanden Meiners und Mitarbeiter, dass die Behandlung von Säugetierzellen mit Proteasominhibitoren ebenfalls eine moderat verstärkte Expression aller 26S Untereinheiten um das 2-4 fache nach sich zieht (Meiners et al. 2003). Die Arbeit machte deutlich, dass die Menge an Proteasomen in Säugetierzellen sowie in Hefe auf der Ebene der Transkription reguliert wird und dass es einen autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus gibt, der die verminderte Proteasomaktivität kompensiert. Somit ähnelt der Regulationsmechanismus in Säugetierzellen wahrscheinlich dem Mechanismus in Hefe. Jedoch fehlt in Säugetierzellen ein zu Rpn4 homologes Protein. Des Weiteren gibt es in den proteasomalen Promotoren in Säugetieren keine PACE-Sequenzen.

Ebenfalls im Jahr 2003 fanden Kwak und Mitarbeiter, dass die Expression der proteasomalen Gene in Säugetierzellen bei oxidativem Stress oder nach Behandlung mit Antioxidantien durch den ARE-Nrf2-Keap1-Signalweg reguliert wird (Kwak et al. 2003). Darüber hinaus ist der ARE-Nrf2-Keap1-Signalweg auch für die erhöhte Transkription der proteasomalen Gene in Kolonkarzinomzellen verantwortlich (Arlt et al. 2009).

1.2 Der ARE-Nrf2-Keap1-Signalweg

Eine der erfolgreichsten Strategien für die Prävention gegen Krebs (Wattenberg 1985; Hong and Sporn 1997), chronische Entzündungen und neurodegenerative Erkrankungen, ist die Beseitigung von endogenen und Umweltkarzinogenen. Diese können innerhalb der Zelle zu oxidierten Proteinen bzw. Phospholipiden und zur Schädigung der DNA führen. Zu den Mechanismen, die diese reaktiven Verbindungen beseitigen, gehören die Phase-2-Reaktionen, welche durch Phase-2-Enzyme katalysiert werden. Zu den Phase-2-Enzymen gehören z.B. die NQO1 (NAD(P)H-Chinon Oxidoreduktase 1), die GST (Glutathion-S-

Transferase) und die HO-1 (Häm-Oxygenase 1). Genomische Analysen zeigten, dass Phase-2-Gene am cis-Element antioxidant response element (ARE), eine spezifische Promotorregion, durch zahlreiche Antioxidantien oder Elektrophile transkriptionell aktiviert werden können. Gefunden wurde das ARE in der 5' flankierenden Region des NQO1 Gens und der Gene verschiedener GSTs (Rushmore et al. 1991; Chanas et al. 2002). Rushmore und Mitarbeiter schlugen folgende „core“-ARE-Konsensussequenz vor: 5'TGACNNNGC-3'. Jedoch wurde diese durch Analysen zahlreicher AREs anderer Gene auf die Sequenz 5'TGANNNGC-3' erweitert (Jaiswal 2004). Zu den typischen ARE-Aktivatoren gehören verschiedene chemische Verbindungen, wie Akzeptoren der Michael-Reaktion, Diphenole, Chinone (*tert*-butylhydroquinone: *t*-BHQ), Isothiocyanate (Sulforaphan), Peroxide, Schwermetalle, Dithiolethione (D3T) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Prester et al. 1993). Yamamoto und Mitarbeiter berichteten, dass der Transkriptionsfaktor Nrf2 (nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2) für die durch ARE-Aktivatoren verstärkte Expression von Phase-2-Genen verantwortlich ist (Itoh et al. 1997). Der Transkriptionsfaktor Nrf2 gehört auf Grund von Sequenzähnlichkeiten zu dem CNC-Protein (Cap'n'collar) aus *Drosophila* zur Klasse der „Cap'n'collar basic leucine zipper“ (bZIP) Proteine. Nrf2 kann nicht als Monomer oder Homodimer an das ARE binden, sondern dimerisiert mit einem der anderen basic leucine zipper wie z.B. den kleinen Maf-Proteinen oder c-Jun (Itoh et al. 1997; Venugopal and Jaiswal 1998).

Das für die Regulation von Nrf2 entscheidende Protein ist Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) (Itoh et al. 1999). Dieses cytosolische Protein ist reich an Cysteinen und besitzt eine strukturelle Ähnlichkeit zum Kelch Protein aus *Drosophila*. Keap1 ist ein negativer Regulator von Nrf2 und interagiert mit dessen N-terminaler Neh2 Domäne. Es wurden 5 Domänen in Keap1 charakterisiert: NTR (N-terminal region), BTB (broad complex/tramtrack/bric-a-brac), IVR (intervenning region), Kelch/DGR (double glycine repeat) und CTR (C-terminal region). Die BTB-Domäne ist wichtig für die Dimerisierung von zwei Keap1-Molekülen und die IVR Domäne besitzt zahlreiche Cysteinreste, die für die Funktion als Redoxsensor essentiell sind. Mit der DGR-Domäne bindet Keap1 an das Aktinzytoskelett, wodurch Nrf2 im Cytosol festgehalten werden soll (Kang et al. 2004). Zusätzlich vermitteln die Kelch Motive in der DGR-Domäne die Interaktion mit der N-terminalen Neh2-Domäne von Nrf2. In der Neh2-Domäne wurden die 2 Sequenzmotive ETGE und DLG als die Hauptverantwortlichen für die Interaktion mit dem Keap1-Homodimer ausfindig gemacht (Abb. 1.9, (Tong et al. 2006a)).

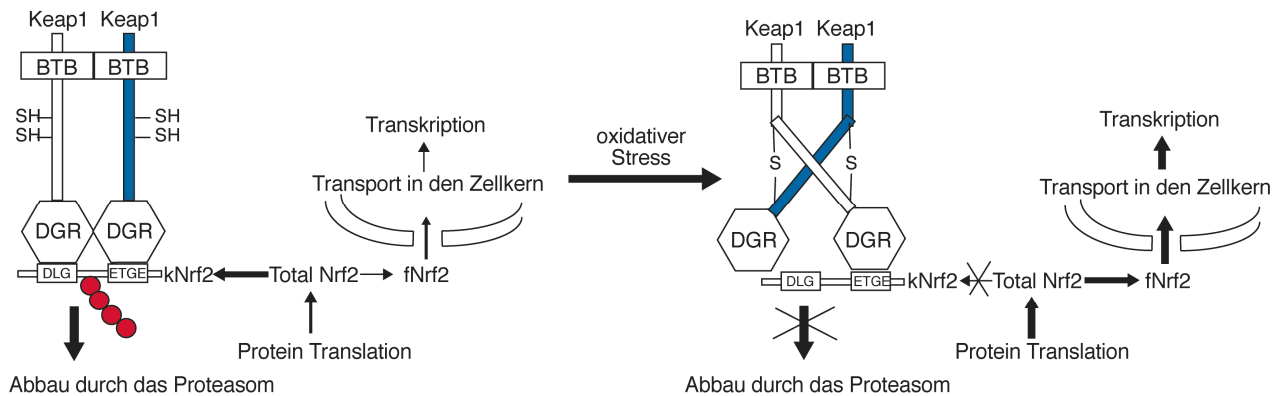


Abb. 1.9: Der ARE-Nrf2-Keap1-Signalweg In der Zelle existieren zwei Arten von Nrf2 Molekülen. Die an Keap1 gebundenen Nrf2 Moleküle (kNrf2) und die ungebundenen Nrf2 Moleküle (fNrf2). Unter physiologischen Bedingungen bindet jeweils ein kNrf2 über seine Sequenzmotive ETGE und DLG an die DGR-Domänen eines Keap1-Dimers. Dadurch wird kNrf2 ubiquitiniert und durch das 26S Proteasom abgebaut. Zusätzlich besteht ein Gleichgewicht zwischen der Nrf2 Translation und dessen Abbau. Somit gibt es nur wenige fNrf2 Moleküle, die für die basale Transkription der Nrf2 Zielgene sorgen. Durch oxidativen Stress kommt es durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zu Konformationsänderungen im Keap1-Dimer. Dies führt dazu, dass die schwache DLG-DGR Interaktion zwischen Keap1 und Nrf2 aufgehoben wird und die kNrf2 Moleküle weniger ubiquitiniert und abgebaut werden. Die kNrf2 Moleküle bleiben jedoch über die ETGE-DGR Interaktion am Keap1-Dimer gebunden, wodurch die Keap1-Dimere mit kNrf2 abgesättigt bleiben. Die Translation von Nrf2 ist ebenfalls verstärkt und dadurch wird zusätzlich die Gesamtmenge an Nrf2 Molekülen (Total Nrf2) erhöht. Gleichzeitig erhöht sich die Anzahl an fNrf2, da die fNrf2 Moleküle nicht an die mit kNrf2 Molekülen abgesättigten Keap1-Dimere binden können. Die Menge an fNrf2 im Zellkern steigt und die Transkription von Nrf2 Zielgenen wird erhöht. (modifiziert nach (Li and Kong 2009))

Die starke Bindung des ETGE-Motivs fungiert als eine Art Scharnier („hinge“), welches Nrf2 fest mit dem einen Keap1 Molekül verankert, während die lose Bindung des DLG-Motivs an das zweite Keap1 Molekül als Riegel („latch“) agiert. Durch die Bindung beider Sequenzmotive gelangen 7 Lysinreste innerhalb der Neh2-Domäne auf eine Seite und werden wahrscheinlich dadurch der Ubiquitinierung durch den Cullin3 Ubiquitinligase-Komplex und dem Abbau durch das 26S Proteasom zugänglich (Kobayashi et al. 2004a; Tong et al. 2006a; Tong et al. 2006b). Nrf2 wird somit unter physiologischen Bedingungen konstant abgebaut. Die Halbwertszeit beträgt ca. 15-30 min (Stewart et al. 2003; Chen et al. 2009). Im Gegensatz zu früheren Annahmen muss die Interaktion daher transient und nicht anhaltend sein. Dies und die Tatsache, dass Nrf2 nicht nur an der induzierbaren, sondern auch an der basalen Transkription einiger seiner Zielgene beteiligt ist (Nguyen et al. 2005), bedeutet, dass Nrf2 auch unter physiologischen Bedingungen im Zellkern vorkommt und stetig exprimiert wird (Nguyen et al. 2003; Nguyen et al. 2005). Daher wird auch ein Abbau direkt im Zellkern oder ein Transport aus dem Zellkern diskutiert. Dieser Abbau ist ebenfalls abhängig von Keap1 und Cullin3 Ubiquitinligase-Komplexen, da diese auch im Zellkern vorkommen (Sun et al. 2007; Nitire and Jaiswal 2009). Unter oxidativen Bedingungen kommt es zur Oxidation der Cysteine C273 und C288 in der IVR-Domäne von Keap1, was zur Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken und somit zur Änderung der Keap1 Konformation führt (Wakabayashi et al. 2004; Dinkova-Kostova et al. 2005). Dadurch wird

die schwache Bindung des DLG-Motivs mit den Kelch Motiven aufgelöst. Das hat eine verminderte Ubiquitinierung von Nrf2 zur Folge, aber unterbricht nicht die Bindung (McMahon et al. 2006; Tong et al. 2006b). Als Konsequenz steigt das intrazelluläre Level von Nrf2 an, da der Abbau reduziert wird und neu gebildete Nrf2 nicht an die schon mit Nrf2 gebundenen Keap1 Moleküle binden können. Folglich kommt es zur Aktivierung der Zielgene von Nrf2 (Kobayashi and Yamamoto 2006).

1.3 Der Transkriptionsfaktor c-Jun

C-Jun gehört so wie Nrf2 zur Klasse der basic leucine zipper und bildet in Säugetierzellen hauptsächlich mit c-Fos den dimeren Komplex AP1 (activator protein 1). Eine genetische Deletion des Gens für c-Jun ist embryonal lethal (Hilberg et al. 1993). Der Komplex AP1 erkennt das TRE (TPA responsive element), welches eine ähnliche Sequenz zum ARE besitzt (ARE: TGANNNGC; TRE: TGACTCA) (Lee et al. 1987). Im Verbund mit dem Transkriptionsfaktor ATF2 (activating transcription factor 2) bindet c-Jun an das CRE (cAMP responsive element, TGACGTCA) (Hai and Curran 1991). Der Transkriptionsfaktor c-Jun ist vorwiegend ein Regulator der Zellproliferation, in dem er die Transkription von Zellzyklusregulatoren wie Zyklinen und p53 reguliert (Schreiber et al. 1999; Bakiri et al. 2000). C-Jun wird durch die Phosphorylierungen seiner Serine 63 und 73 von den Kinasen JNK1-III aktiviert (c-Jun N-terminal kinase) (Pulverer et al. 1991; Smeal et al. 1991; Derijard et al. 1994), wodurch gleichzeitig dessen Ubiquitinierung und Abbau durch das 26S Proteasom verhindert wird (Fuchs et al. 1996; Musti et al. 1997). Des Weiteren ist beschrieben, dass die Transkription der NQO1 und der GST Untereinheit Ya durch einen Komplex aus Nrf2 und c-Jun reguliert wird (Venugopal and Jaiswal 1998).

1.4 Die Transkriptionsfaktoren TCF11/Nrf1

Der Transkriptionsfaktor Nrf1 (nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 1) ist ein Homolog von Nrf2 und gehört somit ebenfalls zur Klasse der CNC-basic leucine zipper (Chan et al. 1993). In Mäusen codiert das Gen für Nrf1, NFE2L1, für ein 741 Aminosäuren großes Protein. Dagegen besteht Nrf1 im humanen System aus 742 Aminosäuren. Zusätzlich zu Nrf1 gibt es im humanen System die Isoform TCF11 (transcription factor 11), die ein weiteres Exon besitzt, wodurch TCF11 um 30 Aminosäuren größer wird (Abb. 1.10, (Chan et al. 1993; Luna et al. 1994; Luna et al. 1995)). Dieses Exon enthält ein potentiell „nuclear export signal“ (NES) (Husberg et al. 2003).

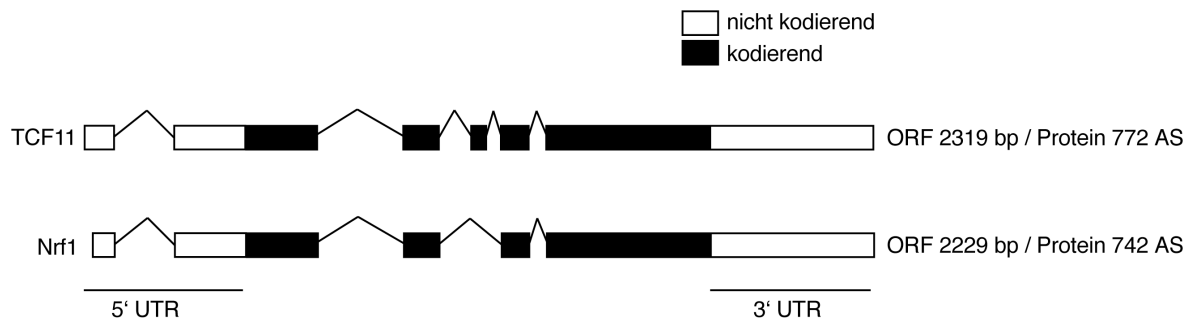


Abb. 1.10: Exonzusammensetzung der mRNAs für TCF11 und Nrf1 im humanen System

Anfänglich wurde die Isoform TCF11 auf Grund von mikroskopischen Aufnahmen sowohl als cytosolisches als auch nukleäres Protein beschrieben. Hingegen sollte Nrf1 vorwiegend nukleär lokalisiert sein, da diesem das NES fehlt (Husberg et al. 2003). Neuere Arbeiten beschreiben Nrf1 jedoch als ein ER-ständiges Membranprotein (Wang and Chan 2006; Zhang et al. 2006), das zusätzlich auch in der inneren Kernmembran (nuclear envelope) vorkommt (Zhang et al. 2009b). Die Aminosäuren 7-24 weisen Charakteristika einer hydrophoben α -Helix auf, die Nrf1 in der ER-Membran verankern soll. Eine Deletion dieser Aminosäuren führt zu einer vorwiegenden nukleären Lokalisation von Nrf1 (Wang and Chan 2006; Zhang et al. 2007). Weiter wurde gezeigt, dass das in der ER-Membran verankerte Nrf1 N-glykosyliert ist. Dies soll einen Einfluss auf seine Lokalisation und Funktion haben (Zhang et al. 2006; Zhang et al. 2009b). Zwischen den Aminosäuren 171-241 besitzen sowohl Nrf1 als auch TCF11 eine Domäne, die der Neh2 Domäne aus Nrf2 sehr ähnlich ist. Diese Neh2-ähnliche Domäne enthält ebenfalls die ETGE und DLG Motive, die für die Regulation von Nrf2 durch Keap1 notwendig sind (Abb. 1.11, (Tong et al. 2006a; Wang and Chan 2006; Zhang et al. 2006)).

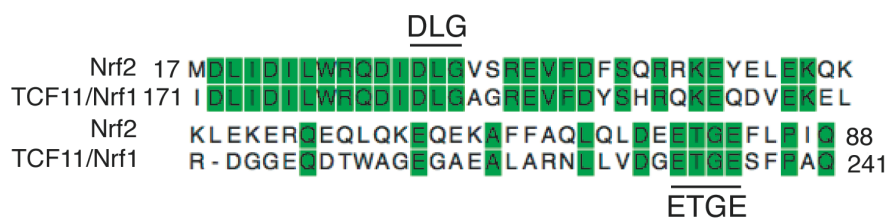


Abb. 1.11: Aminosäuresequenzvergleich von Abschnitten der Neh2 Domäne von Nrf2 und der Neh2-ähnlichen Domäne von TCF11 bzw. Nrf1 In grün hinterlegt sind die identischen Aminosäuren in beiden Sequenzen. Des Weiteren sind das DLG- und das ETGE-Sequenzmotiv markiert.

Trotz einer Interaktion der Neh2-ähnlichen Domäne von Nrf1 mit Keap1, hat eine Deletion der ETGE und DLG Motive keinen Einfluss auf die Aktivität von Nrf1 (Zhang et al. 2006; Zhang et al. 2009b). Des Weiteren ist die Affinität von Keap1 zu Nrf1 um das 3,5 fache geringer als zu Nrf2 (Kobayashi et al. 2004b). Demnach ist eine Beteiligung von Keap1 am Abbau von Nrf1 bzw. TCF11 nicht sehr wahrscheinlich, jedoch auch nicht ausgeschlossen. Ein Keap1 unabhängiger Abbaumechanismus ist jedoch nicht bekannt. Obwohl Nrf2 als der hauptverantwortliche Transkriptionsfaktor identifiziert wurde, der Phase-2-Gene unter

oxidativen Bedingungen über das ARE aktiviert, konnte auch ein Einfluss von Nrf1 auf die Transkription dieser Gene beobachtet werden. In Fibroblasten, die aus Nrf1 „knockout“ Embryonen gewonnen wurden, waren die Expressionen der GSS (glutathione synthetase) und einer Untereinheit der GCS (gamma-glutamylcysteine synthetase) verringert, was in einem niedrigen Level von Glutathion resultierte (Kwong et al. 1999). Durch das verminderte Glutathionlevel war die Menge an ROS deutlich erhöht. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Nrf1 als Heterodimer mit einem der kleinen Maf Proteine an das ARE aus dem GCS_L-Promotor binden kann. Für TCF11 wurde ebenfalls gezeigt, dass es als Heterodimer mit einem der kleinen Maf Proteine an AREs bindet (Myhrstad et al. 2001). Darüber hinaus wird Nrf1 durch das bekannte Antioxidant *t*-BHQ aktiviert (Zhang et al. 2009b). Somit besitzen Nrf1 und TCF11 ebenfalls eine Funktion in der Abwehr von oxidativem Stress. Diese Funktion scheint sich jedoch von der von Nrf2 zu unterscheiden, da nur ganz bestimmte Phase-2-Gene ausschließlich durch Nrf1 aktiviert werden (Ohtsui et al. 2008). So waren z.B. die Expressionen von MT-1 und MT-2 (Metallothionein -1 und -2) im Vergleich zu Nrf2 „knockout“ Zellen nur in Nrf1 defizienten Zellen verringert. Neben der Funktion in der Abwehr von oxidativem Stress, ist Nrf1 auch wichtig für die embryonale Entwicklung, da eine Deletion des NFE2L1 Gens zum frühen Tod von Mausembryonen führt (Chan et al. 1998). Nrf1 reguliert z.B. die Expression des Transkriptionsfaktors Osterix, welcher eine wichtige Funktion in der Differenzierung von Osteoblasten und somit im Knochenaufbau besitzt (Xing et al. 2007). Abschließend sei zu erwähnen, dass Nrf1 und TCF11 nicht nur Aktivatoren sind, sondern auch Inhibitoren der Transkription. Zum Beispiel ist TCF11 für die durch TGF- β (transforming growth factor- β) induzierte Inhibition der iNOS (inducible nitric oxide synthetase) Expression verantwortlich (Berg et al. 2007). Die iNOS ist in Phagozyten für die Bildung von Nitritoxid zuständig, welches von diesen z.B. zur Bekämpfung von Bakterien sezerniert wird (Chakravorty and Hensel 2003).

1.5 Zielsetzung

Das 26S Proteasom ist die wichtigste intrazelluläre Protease von eukaryotischen Zellen für den regulierten Abbau von ubiquitinierten Proteinen. Während über den Aufbau, die Assemblierung und die Funktion des 26S Proteasoms relativ viel bekannt ist, weiß man über die transkriptionelle Regulation der proteasomalen Gene noch relativ wenig. In Hefe reguliert der Transkriptionsfaktor Rpn4 die Transkription der proteasomalen Gene, der jedoch in Säugetierzellen nicht existiert. Über die Regulation in Säugetieren ist bekannt, dass in Mäusen durch oxidativen Stress oder nach der Behandlung mit Antioxidantien die Transkription der proteasomalen Gene durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 aktiviert wird und dass Nrf2 auch für die erhöhte Transkription der proteasomalen Gene in Kolonkarzinomzellen verantwortlich ist. Des Weiteren kommt es wie in Hefe nach der Hemmung des 26S Proteasoms mit chemischen Proteasominhibitoren zu einer verstärkten konzertierten Transkription aller proteasomalen Gene. Der dafür verantwortliche Transkriptionsfaktor ist jedoch noch nicht identifiziert. Da einige Krebszellen nicht mit einer verstärkten Transkription der proteasomalen Gene auf die Proteasominhibition antworten und diese auch sensibler mit Hinblick auf Apoptose auf die Proteasominhibition reagieren, werden Proteasominhibitoren aus pharmazeutischer Sicht immer interessanter. Andererseits gibt es Krebszellen, die gegenüber Proteasominhibitoren resistent sind. Aufgrund dieser beiden Tatsachen ist es von großem Interesse herauszufinden, welcher Transkriptionsfaktor für die erhöhte Expression der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition verantwortlich ist, da dieser als „Target“ zur Behandlung von Krebs dienen könnte. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher herauszufinden, ob Nrf2 auch die Transkription nach Proteasominhibition reguliert und somit der Mechanismus zu dem bei oxidativem Stress oder nach der Behandlung mit Antioxidantien identisch ist oder ob es einen anderen Transkriptionsfaktor gibt, der diese Funktion übernimmt.

Darüber hinaus sollte untersucht werden, welche Auswirkung die Proteasominhibition auf die Expression anderer im UPS involvierter Gene besitzt, da diese für den Abbau von Proteinen ebenso wichtig sind und welchen Einfluss Nrf2 bzw. der gefundene Transkriptionsfaktor auf diese Expressionen hat.

2 Materialien und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Bezogen von
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences
MG132	Calbiochem
Epoxomicin	Calbiochem
c-Lactacystin	Calbiochem
BSc2118	Labor Stock
DMSO	Appllichem
poly (dl/dC)	GE Healthcare
Opti-MEM®	Gibco
Hoechst33258	Sigma-Aldrich
PMSF	Sigma-Aldrich
MTT	Sigma-Aldrich
Cycloheximid	Sigma-Aldrich
NEM (N-Ethylmaleimid)	Sigma-Aldrich
t-BHQ	Alexis

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zellen und Medien

Zelllinie: Ea.hy926 (humane Nabel-Vene Endothelzellen (HUVEC) fusioniert mit der permanenten humanen Zelllinie A549 (Edgell et al. 1983))

Kulturmedium: basal Iscove (Biochrom) Medium komplett: 10 % FCS (Biochrom), 100 mg/ml Penicillin/Streptomycin (Seromed), 2 mM L-Glutamin (Biochrom)

2.2.2 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Die Kultivierung von adhärenenten Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Das Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturschale erfolgte nach einmaligem Waschen mit 1 x PBS durch Trypsinierung mit Trypsin/EDTA-Lösung (GibcoBRL). Die Zellsuspension wurde, um das Trypsin zu inaktivieren, 1:10 mit Medium verdünnt und bei 200 xg, 4 °C für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde im Medium resuspendiert und die Zellen 1:4 bis 1:6 verdünnt neu ausgesät.

1 x PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄ pH 7,2

2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Auftauen von Zellen wurden diese schnell im Wasserbad aufgetaut und dann sofort 1:10 im Medium verdünnt. Danach wurden die Zellen bei 200 xg für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert, im Medium resuspendiert und auf einer Kulturschale ausgesät.

$1-2 \times 10^6$ Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in einer mit Isopropanol gefüllten Kryobox von 4 °C auf -80 °C heruntergekühlt. Nach 1-2 Tagen wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert.

Einfriermedium: Medium supplementiert mit 20 % FCS und 10 % DMSO

2.2.4 Ernten und Aufschluss von humanen adhärennten Zellen

Zum Ernten der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Um die Zellen von der Kulturschale abzulösen, wurde Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen pipettiert, bei 37 °C inkubiert und leicht an die Kulturschale geklopft. Durch die Zugabe von Kulturmedium wurde das Trypsin inaktiviert, die Zellen durch mehrmaliges auf und ab Pipettieren im Medium resuspendiert und bei 200 xg für 5 min und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in PBS resuspendiert. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 6800 xg, 4 °C für 2 min. Das PBS wurde abgesaugt und das Pellet entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert oder zur Lyse der Zellen in RIPA-Puffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation von 30 min auf Eis. Im Anschluss wurde das Lysat bei 17900 xg, 4°C für 10 min zentrifugiert. Vom Überstand wurde die Proteinkonzentration bestimmt und entweder wurde der Überstand gleich weiter verarbeitet oder bei -80 °C gelagert.

RIPA-Lysepuffer: 50mM Tris HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0,1 % (w/v) SDS, 0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat, 1x complete, 1x phosSTOP, 10 µM MG132

2.2.5 Transfektion von Säugetierzellen mit Plasmid-DNA

Zur Transfektion von Ea.hy926 Zellen wurden diese am Abend des Vortages in einem Serum und Antibiotikum haltigem Medium ausgesät. Am nächsten Morgen erfolgte die Transfektion. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamin 2000 (Invitrogen) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet, mit Ausnahme des Verhältnisses von DNA zu Lipofectamin 2000. Hier wurde ein Verhältnis von 1:1 gewählt, da das vorgeschlagene Verhältnis von 1:2,5 zu vermehrtem Zelltod führte. Während der Inkubation von DNA mit Lipofectamin 2000 wurde das Serum und Antibiotikum haltige Medium auf den Zellen durch Medium ohne Antibiotikum ersetzt. Nach ca. 8 h Transfektion wurde das Medium durch

frisches Medium, nun antibiotikahaltig, ersetzt und die Zellen für weitere 16 bzw. 40 h je nach Versuch transfiziert.

Tab. 2.1: Verwendete DNA-Konstrukte

Bezeichnung	Insert	Schnittstellen	Vektor	Hersteller
Nrf2	Nrf2 (ORF)	BamH1/Kpn1	pcDNA3.1-Zeo(-)	AG Prof. Dr. W. Dubiel (Charité)
c-Jun	c-Jun (ORF) N-term. Flag-Epitop		pcDNA3.1-Zeo(+)	
Flag-TCF11	TCF11(ORF) N-term. Flag-Epitop	Kpn1/EcoR1	pcDNA3.1-Zeo(+)	
TCF11-Flag	TCF11(ORF) C-term. Flag-Epitop	Kpn1/EcoR1	pcDNA3.1-Zeo(+)	
TCF11-V5	TCF11 (ORF) ohne Stopcodon	Kpn1/Xba1	pcDNA3.1- V5/His-TOPO	
Nrf1-V5	Nrf1 (ORF) ohne Stopcodon	Kpn1/Xba1	pcDNA3.1- V5/His-TOPO	
Nrf1-myc	Nrf1 (ORF) ohne Stopcodon	Kpn1/Xba1	pcDNA3.1- myc/his	
MafG	MafG (ORF) ohne Stopcodon	BamH1/EcoR1	pcDNA3.1- myc/His	
Myc-Keap1	Keap1 (ORF)	BamH1/Xho1	pCMV-Tag3	
HRD1	HRD1 (ORF) C-term. Myc-Epitop	EcoR1/BamH1	pSG5	M. Seeger
HRD1-C329S	HRD1 (ORF) Mutation: C329S C-term. Myc-Epitop	EcoR1/BamH1	pSG5	M. Seeger
UBE2J1	UBE2J1 (ORF) N-term. Myc-Epitop		pCMVPLD	(Lenk et al. 2002)
UBE2J1-C91S	UBE2J1 (ORF) Mutation: C91S N-term. Myc-Epitop		pCMVPLD	(Lenk et al. 2002)
HA-Ubiquitin-GFP	Ubiquitin (ORF) N-term. HA-Epitop C-term. GFP		pEGFP-N3	A. Wiemhöfer
SEL1L	shRNA gegen SEL1L Zielsequenz: GGCUAUACUGUG GCUAGAAUU		pSuper	M. Kny
pCAT1500	ca. 1500 bp vom PSMB6 Promotor		pCAT3basic	D. Heyken
pCAT100	ca. 100 bp vom PSMB6 Promotor Entstanden durch Exonuclease3 Verdau vom pCAT1500		pCAT3basic	D. Heyken
pCAT60	ca. 100 bp vom PSMB6 Promotor Entstanden durch Exonuclease3		pCAT3basic	D. Heyken

Bezeichnung	Insert	Schnittstellen	Vektor	Hersteller
	Verdau vom pCAT1500			
pCAT1500 Mut-17	wie pCAT1500, mit mutiertem ARE-17		pCAT3basic	
pCAT1500 Mut-26	wie pCAT1500, mit mutiertem ARE-ähnlich -26		pACT3basic	
pCAT1500 Mut -69	wie pCAT1500, mit mutiertem ARE-ähnlich -69		pCAT3basic	
pCAT1500 Mut -135	wie pCAT1500 mit mutiertem ARE-ähnlich -135		pCAT3basic	
pCAT1500 Mut -590	wie pCAT1500 mit mutiertem ARE-ähnlich -590		pCAT3basic	
pCAT1500 Mut -17/-69	Wie pCAT1500 mit mutiertem ARE -17 und ARE-ähnlich -69		pCAT3basic	
pcDNA3.1-Zeo/lacZ	lacZ (ORF)		pcDNA3.1-Zeo(+)	Invitrogen

2.2.6 Transfektion von siRNA

Für die Transfektion von siRNAs in adhärenzte Zellen wurden diese am Vorabend der Transfektion in Komplett-Medium ausgesät. Am Morgen des nächsten Tages erfolgte die Transfektion. Bei Transfektionen in 24 bzw. 6 well Platten erfolgte die Transfektion wie im Handbuch des Transfektionsreagenz HiPerFect (Qiagen) beschrieben. Dabei betrug die Zelldichte im 24 well 3×10^4 und im 6 well $1,2 \times 10^5$ Zellen pro well. Für die Transfektion von Zellen in 10 cm Platten wurde ein abgewandeltes Protokoll benutzt. Dafür wurden 10^6 Zellen in 10 ml Medium wie oben beschrieben am Vorabend ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium auf den Zellen durch 4,5 ml frisches Medium ersetzt. In 500 µl Opti-MEM® Medium wurden sowohl die siRNA als auch das HiPerFect verdünnt, gevortext und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die siRNA-HiPerFect-Komplexe wurden danach tropfenweise auf die Zellen pipettiert und durch Schwenken der Kulturschale im Medium verteilt. Nach 24 h wurden weitere 5 ml komplett Medium auf die Zellen gegeben. Die Transfektionen dauerten normalerweise 54-72 h und die Konzentration der siRNA betrug bei allen Transfektionsansätzen 50 nM.

Tab. 2.2: Verwendete siRNAs

siRNA gegen	Zielsequenz	Bezogen von
TCF11/Nrf1	GCAGACAUUUCCAGCAUAA GGGAUUCGGUGAAGAUUUG CCAACACUCCCAUCAUUA GGACGUGGAUACUUACCUG	Dharmacon

siRNA gegen	Zielsequenz	Bezogen von
gp78	GCAAGGAUCGAUUUGAAUA GGACGUAUGUCUAUUACAC GAAUUCGUCGGCACAAGAA GUAAAUACCGCUUGCUGUG	Dharmacon
HRD1	UCAUCAAGGUUCUGCUGUA GAGAAGAGAUGGUGACUGG CAACAUGAACACCCUGUAU GGAAAGGCCUCCAGCUCCU	Dharmacon
TEB4	UCAUAGAUCUCGUCGCUUA CAUACAAUGUCAUGCUCUA ACGGAAAUCUGGCAAACAA CUAAGGAAUUUGAAUGAUC	Dharmacon
AUP1	GCACUAUAUGAAUACGCAA GCAGAUUCGUAGUGCGGAC GAGCACAUGAAGCGACAAA CGACCACAACAUAGUCAAU	Dharmacon
HERP	CGACAGUACUACAUGCAAU GGGCCACCGUUGUUAUGUA GGCUUCAGCUUCCUGGUU GCGGAUGAAUGCACAAGGU	Dharmacon
Derlin1	GGGCCAGGGCUUUCGACUU CAAUUAUGUUGCACGUACA CAACAAUCAUAUUCACGUU GAGAGACCCUCAUACGCUA	Dharmacon
Derlin2	CUAUAUUCGUUACUGUCGAA GUCUAUGUGUGGAGCCGAA CUGCAGAUCCCACCGGUCA AGGACAAAAUAAAACGGAA	Dharmacon
Derlin3	GGGUCAACUUCUUCGGCCU GGGAUUGCGGUGGGCCAU UCUGGAGGCUCGUCACCAA GAACAAACACCUCAGCAAU	Dharmacon
USP7	AAGCGUCCCUUUAGCAUUA GCAUAGUGAUAAACCUGUA UAAGGACCCUGCAAUUUAU GUAAAGAAGUAGACUAUCG	Dharmacon
UBE2J1	CUUUGAGUUAUAAUAUGGU GUUUUAAGUUCCAAUGAGU CCAUAUUCACACAAAUUA UGUUUGUGUUGGGAUUAUU	Dharmacon
p97	GCAUGUGGGUGCUGACUUA CAAAUUGGCUGGUGAGUCU CCUGAUUGCUCGAGCUGUA GUAAUCUCUUCGAGGUUAU	Dharmacon
Sec61 α	CGGCCAGUCUAUCGUGUAU ACUUUGAGAUCUUCGUUAA GUGUCAUCCUGCCGGAAAU CCAUGCAGUUGUAUACAUA	Dharmacon
Keap1	GGACAAACCGCCUUAUUC CAGCAGAACUGUACCUGUU GGGAGUACAUCUACAUGCA CGAAUGAUCACAGCAAUGA	Dharmacon

siRNA gegen	Zielsequenz	Bezogen von
Nrf2	vom Hersteller nicht angegeben	Qiagen
c-Jun	vom Hersteller nicht angegeben	Qiagen
VIMP	CUGGCGGATGAGGCTAAGAAT	Qiagen
Kontroll siRNA	UGGUUUACAUGUCGACUAA	Dharmacon
Kontroll siRNA	vom Hersteller nicht angegeben	Qiagen

2.2.7 Immunzytochemie

Ea.hy926 Zellen wurden in 24 well Platten auf Deckgläsern kultiviert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd für 20 Minuten bei RT fixiert und anschließend mit 0,2 % (v/v) Triton X-100/PBS für 10 Minuten permeabilisiert. Für die Immunfärbung von nukleären Proteinen wurden die Zellen für 7 Minuten bei -20°C in Methanol fixiert und gleichzeitig permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 3 % (w/v) FCS in PBS für 10 Minuten abgesättigt. In einer feuchten Kammer erfolgte für 45 Minuten bei RT die Inkubation mit dem Primärantikörper. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der Sekundärantikörper auf die Deckgläschen gegeben und ebenfalls für 45 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS und einmal mit dH₂O gewaschen, um die Bildung von Salzkristallen zu vermeiden. Für die Markierung der Kerne wurden die Zellen für 5 Minuten mit Hoechst 33258 (1 µg/ml Hoechst in PBS) inkubiert. Um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurde zweimal für 5 Minuten mit PBS und einmal mit dH₂O gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit Immumount (Thermo Scientific) auf Objektträger eingebettet. Die Immunzytochemie erfolgte mit Unterstützung von Frau Dr. Annett Koch.

2.2.8 Cycloheximid „chase“

Ea.hy926 Zellen wurden entweder in 10 cm Schalen mit siRNAs oder mit Plasmid-DNA transfiziert (Beschreibung siehe 2.2.5. bzw. 2.2.6.). Nach ungefähr 32 h Transfektion wurden die Zellen abgelöst, gezählt, $4,7 \times 10^5$ Zellen (siRNA) bzw. $5,5 \times 10^5$ (Plasmid-DNA) pro 6 well ausgesät und für weitere 20 h kultiviert. Das sich auf den Zellen befindende Medium wurde durch frisches mit 50 µg/ml Cycloheximid versetztem Medium ersetzt und die Zellen nach 15 bzw. 30 min wie unter 2.2.4. beschrieben geerntet. Für die 0 min Kontrolle, wurden die Zellen nicht mit Cycloheximid behandelt, sondern gleich geerntet.

2.2.9 Metabolische ³⁵S-markierung von Zellen und Immunpräzipitation (IP) von 20S Proteasomen

Für die metabolische Markierung von Ea.hy926 Zellen wurden $4,5 \times 10^5$ Zellen/6well mit 4 µg Plasmid-DNA für 24 h oder $1,2 \times 10^5$ Zellen/6well mit 50 nM siRNA transfiziert. Nach 48 h

Transfektion wurden die mit siRNA transfizierten Zellen mit 10 nM Epoxomicin behandelt. Anschließend wurden die Zellen in beiden Ansätzen zweimal mit PBS gewaschen und für 1 h in supplementierten Methionin-freiem RPMI-Medium (1 % dialysiertes FCS, 1 % L-Glutamin) inkubiert. Zur *in vivo* Markierung wurden 100 μCi ^{35}S -Methionin/ ^{35}S -Cystein (TRAN ^{35}S -label; MP Biomedicals) in jedes well pipettiert und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO_2 für 3 h markiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit kaltem PBS, wurden die Zellen direkt auf der Platte mit 500 μl NP-40-Lysepuffer für 5 min auf Eis aufgeschlossen. Durch eine anschließende Zentrifugation wurden die Zelltrümmer entfernt und vom Überstand wurde mittels Flüssigszintillationsmessung (Wallac1410 Liquid Scintillation counter, PHARMACIA; EcolumeTM, ICN) die ^{35}S -Aktivität bestimmt. 5×10^6 dpm wurden für die Immunpräzipitation von markierten neu assemblierten 20S Proteasomen eingesetzt. Die IP erfolgte mit 1 μg $\alpha 6$ Antikörper (MCP20) über Nacht auf dem Rad. Am nächsten Tag folgte nach der Zugabe von Protein-G-Sepharose zum IP-Ansatz eine weitere Stunde Inkubation auf dem Rad. Die Protein-G-Sepharose wurde durch Zentrifugation (560 xg, 1 min, 4 °C) pelletiert und viermal mit 900 μl 2 x PBS + 0,5 % NP-40 gewaschen. Im Anschluss wurde die Protein-G-Sepharose in 2 x SDS Probenpuffer aufgekocht und die 20S Proteasomen über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde auf Filterpapier getrocknet und die Detektion der Radioaktivität erfolgte am Phosphorimager (FLA3000, FUJI) oder mit einem Autoradiographie-Film.

NP-40-Lysepuffer: 50 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, 0,5 % NP-40, complete, 10 μM MG132

2.2.10 *In vivo* Ubiquitinierung

Um die Ubiquitinierung von TCF11 *in vivo* zu analysieren, wurden Zellen mit HA-Ubiquitin-GFP (5 μg), TCF11-Flag (10 μg) und HRD1-myc (15 μg) oder HRD1-C329S-myc (15 μg) in 10 cm Schalen mit Lipofectamin 2000 transfiziert. Nach 24 h Transfektion wurden die Zellen mit 10 μM MG132 für 6 h behandelt, um den Abbau von ubiquitiniertem TCF11 zu inhibieren. Die Zellen wurden geerntet (siehe 2.2.4.) und in SDS Lyse-Puffer resuspendiert. Um die genomische DNA zu zerkleinern, wurde das Lysat so lange durch eine Nadel (25G) mit Hilfe einer Spritze gezogen, bis die Lösung nicht mehr viskos war. Anschließend wurde das Lysat bei 99 °C für 5 min aufgekocht, um Protein/Protein-Interaktionen aufzuheben und DUBs zu denaturieren. Es folgte eine Zentrifugation bei 17900 xg für 15 min bei 4 °C. Der Überstand wurde 1:10 mit Verdünnungspuffer verdünnt. Für die IP wurden 1200 μg Totallysat und 3 μg TCF11/Nrf1 Antikörper verwendet. Die IP erfolgte in 15 ml Falconröhrchen auf einem Rad bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde zu jedem IP Ansatz Protein-G-Sepharose hinzu gegeben und für 2 h auf dem Rad inkubiert. Die Protein-G-Sepharose wurde bei 560 xg, 5 min, 4 °C pelletiert, mit RIPA-Puffer in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt

und viermal mit RIPA-Puffer für 5 min auf einem Rad gewaschen. Zum Eluieren des ubiquitinierten TCF11 wurde die Protein-G-Sepharose in 2 x SDS Probenpuffer für 6 min aufgekocht.

SDS Lyse-Puffer: 10 mM Tris pH7,5, 150 mM NaCl, 1 % SDS, 10 mM NEM, 10 µM MG132, Complete

Verdünnungspuffer: 10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, Complete, 10 µM MG132, 10 mM NEM

2.2.11 MTT-Assay

Die Zellen wurden in einer 96 well Platte in 100 µl Medium ausgesät und für 24 h mit 10 nM Epoxomicin oder 0,1 % DMSO behandelt. Als weitere Kontrollen dienten vollkommen unbehandelte oder mit 0,5 % NP-40 behandelte Zellen. Es folgte die Zugabe von 50 µl des MTT-Farbstoffes (2,5 g/l) direkt in das Medium und eine Inkubation bei 37 °C für 3 h. Im Anschluss wurden die Zellen durch die Zugabe von 100 µl 10 % SDS für 1 h bei Raumtemperatur lysiert und der Umsatz des MTT-Farbstoffes bei 570 nm gemessen.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem BCA protein assay kit der Firma Pierce in 96 „well“ Platten bestimmt.

2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden 5-25 µg Protein aus Zelllysaten verwendet. Dazu wurden die Proben mit der entsprechenden Menge 6 x Probenpuffer versetzt, so dass die Endkonzentration an Probenpuffer 1 x betrug und für 6 min bei 99 °C erhitzt. Für die Gelelektrophorese nach Lämmli wurden 7,5-12,5 %ige Trenngele verwendet (King and Laemmli 1971).

Trenngel: Acrylamid in entsprechender Konzentration, Bisacrylamid; 0,67 % der Acrylamidkonzentration, 0,75 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS (w/v), 0,1 % APS (v/v), 0,05 % TEMED (v/v)

Sammelgel: 3 % Acrylamid (v/v), 0,15 % Bisacrylamid (v/v), 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % SDS (w/v), 2,5 % APS (v/v), 0,25 % TEMED (v/v)

Laufpuffer: 25 mM Tris pH 8,3-8,5, 200 mM Glycin, 1 % SDS (w/v)

6 x SDS-Probenpuffer: 375 mM Tris pH 6,8, 1 % SDS(w/v), 30 % Glycerin (v/v), 0,5 M DTT, 0,04 % (w/v) Bromphenolblau

2.3.3 Western Blot

2.3.3.1 Proteintransfer

Der Proteintransfer auf die PVDF-Membran (Milipore) erfolgte nach dem Nass-Blotverfahren in einer Mini TransBlot Cell bei 400 mA für 60-90 min abhängig von der Geldicke.

Western-Blot Puffer: 147 mM Glycin, 10 % Methanol (v/v)

2.3.3.2 Proteindetektion mittels Immunreaktion

Um den Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran zu überprüfen, wurde die Membran zunächst mit Amidoblack-Lösung angefärbt und in dH₂O entfärbt. Danach wurde die Membran für 1 h in Blocklösung (3 % Magermilchpulver in TBST-Puffer) geschüttelt, um die Membran mit Protein abzusättigen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper, der in Blocklösung verdünnt wurde, erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler. Anschließend wurde die Membran kurz zweimal in TBST-Puffer geschwenkt und dann bei Raumtemperatur auf dem Schüttler zweimal für 15 min mit TBST gewaschen. Der sekundäre Antikörper, welcher an die Peroxidase gekoppelt war, wurde 1:5000 in Blocklösung verdünnt. Mit diesem wurde die Membran für 60 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurde die Membran erneut wie bereits beschrieben gewaschen.

Die Detektion erfolgte mit dem ECL Plus Western Blotting Reagents von GE Healthcare. Durch Exposition eines Röntgenfilms konnte die entstandene Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

TBST-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween

Tab. 2.3: Primäre Antikörper

primärer Antikörper gegen:	Spezies	Bezogen von:	Verdünnung
α 6 (MCP20) mAk	Maus	(Hendil et al. 1995)	1 : 20000
α 2 pAk	Kaninchen	AG Kloetzel	1 : 10000
β 1 pAk	Kaninchen	AG Kloetzel	1 : 200000
Rpt3 (TBP7-27) mAk	Maus	Biomol Intrn.	1 : 10000
Rpn2 (112-1) mAk	Maus	Biomol Intrn.	1 : 10000
POMP (380) pAk	Kaninchen	AG Kloetzel	1 : 5000
Ecm29 pAk	Kaninchen	C. Enenkel	1 : 20000
Ubiquitin (FK2) mAk	Maus	Biomol Intrn.	1 : 5000
GAPDH (FL-335) pAk	Kaninchen	Santa Cruz	1 : 80000
LaminB1 mAk	Maus	Invitrogen	1 : 2000
Calnexin mAk	Maus	BD	1 : 5000
PDI (SPA890) pAk	Kaninchen	Stressgen	1 : 5000

primärer Antikörper gegen:	Spezies	Bezogen von:	Verdünnung
β -Tubulin mAK	Maus	Covance	1 : 20000
Nrf2 (H-300, C-20) pAK	Kaninchen	Santa Cruz	1 : 5000
Keap1 (E-20) pAK	Ziege	Santa Cruz	1 : 1000
TCF11/Nrf1 (H-285) pAK	Kaninchen	Santa Cruz	1 : 1000
c-Jun (H-79) pAK	Kaninchen	Santa Cruz	1 : 20000
Phospho-c-Jun (S63) mAK	Kaninchen	Cell Signaling	1 : 1000
JNK1/2 mAK	Kaninchen	Cell Signaling	1 : 1000
Phospho-JNK1/2 mAK	Kaninchen	Cell Signaling	1 : 1000
HA mAK	Maus	Roche	1 : 1000
Myc mAK	Maus	Biomol Intern.	1 : 1000
V5 mAK	Maus	Invitrogen	1 : 1000
GFP mAK	Maus	Covance	1 : 5000
HRD1 pAK	Kaninchen	(Kikkert et al. 2004)	1 : 10000
p97 pAK	Kaninchen	M. Seeger	1 : 20000
UBE2J1 mAK	Maus	Abnova	1 : 500
USP7 pAK	Kaninchen	Bethyl Laboratories	1 : 50000
SEL1L mAK	Maus	Alexxis	1 : 500
HERP pAK	Kaninchen	AG Klotzel	1 : 50000
AUP1 pAK	Kaninchen	Sigma-Aldrich	1 : 40000
Derlin1 pAK	Kaninchen	Sigma-Aldrich	1 : 10000
Derlin2 pAK	Kaninchen	MPL	1 : 5000
Sec61 α pAK	Ziege	Affinity Bioreagents	1 : 1000
VIMP pAK	Kaninchen	(Ye et al. 2004)	1 : 1000

2.3.3.3 Strippen der Membran

Um die Membran mit einem weiteren Antikörper zu behandeln, mussten die Antikörper der vorhergehenden Inkubation entfernt werden. Dazu wurde die Membran in 50 ml Falconröhrchen überführt und einmal für 30 min in 15 ml STRIP-Puffer in einem 55 °C warmen Hybridisierungssofen inkubiert. Anschließend wurde die Membran mehrmals gründlich mit Wasser gewaschen und in einen frischen Behälter überführt. Nach zwei Waschschritten in TBST für 10 min wurde für 1 h mit Blocklösung geblockt und mit dem nächsten Antikörper dekoriert.

STRIP-Puffer: 100 mM Tris pH 6,8, 2 % SDS, 0,8 % β -Mercaptoethanol

2.3.4 Nicht-denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (NATIVE-PAGE)

Ea.hy926 Zellen wurden mit Plasmid-DNA für 24 h transfiziert und anschließend mit Ca/Mg freiem Medium von der Zellkulturplatte abgelöst und einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in TSDG-Puffer resuspendiert und durch 3 Frier/Tau Zyklen in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt und 25 µg Protein auf einem NativePAGE™ Novex® 3-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen) aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte mit 150 V für ca. 2 h bei Raumtemperatur. Zur Visualisierung von aktiven Proteasomkomplexen wurde das Gel für 15 min in Testpuffer bei 37 °C im Dunkeln auf einem Schüttler inkubiert und im Anschluss an einem VersaDoc MP 4000 System (Biorad) ausgelesen. Das gleiche Gel wurde danach für 30 min in Western-Blot Puffer inkubiert und dann geblottet. Proteasomkomplexe wurden mit spezifischen Antikörpern und Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

Ca/Mg freies Medium: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,8 mM EDTA, 0,0015 % Phenolrot

TSDG-Puffer: 10 mM Tris pH 7,0, 10 mM NaCl, 25 mM KCl, 1,1 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN₃, 20 % Glycerin

Test-Puffer: 30 mM Tris pH 7,8, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 1 mM NaN₃, 50 µM ATP, 0,5 mM DTT, 200 µM LLVY-AM

Laufpuffer: 50 mM BisTris pH 6,8, 50 mM Tricin

Probenpuffer: 50 mM BisTris pH 7,2, 50 mM NaCl, 10 % (w/v) Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau

2.3.5 Trennung von nicht-nukleären und nukleären Proteinen

Für die Isolation von nicht-nukleären und nukleären Proteinen wurden Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und abgeschabt. Die Zellen wurden bei 500 xg, 10 min, 4 °C pelletiert und anschließend in Puffer A resuspendiert. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurde soviel 10 %ige NP-40-Lösung hinzugegeben, dass die Endkonzentration bei 0,5 % lag. Es folgte eine weitere Inkubation von 5 min auf Eis. Im Anschluss wurden die Kerne bei 5000 xg für 10 min abzentrifugiert und der Überstand als nicht-nukleäre Fraktion bei -80 °C aufbewahrt. Die Kerne wurden einmal mit Puffer A gewaschen und danach in Puffer B für 30 min auf Eis aufgeschlossen. Durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 12000 xg und 4 °C wurde die genomische DNA von den nukleären Proteinen abgetrennt. Der Überstand wurde aliquotiert und ebenfalls bei -80 °C gelagert.

Puffer A: 10 mM HEPES pH 7,82, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, complete w/o EDTA, phosSTOP, 10 µM MG132

Puffer B: 20 mM HEPES pH 7,82, 500 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 % Glycerin, complete w/o EDTA, phosSTOP, 10 μ M MG132

2.3.6 Trennung von cytosolischen, membrangebundenen und nukleären Proteinen

Um cytosolische, membrangebundene und nukleäre Proteine von einander zu trennen, wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen und mit Ca/Mg freiem Medium von der Kulturschale abgelöst. Durch eine Zentrifugation bei 500 xg für 10 min bei 4 °C wurden die Zellen pelletiert und in Puffer 1 resuspendiert und durch 3 Frier/Tau Zyklen in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Es folgte eine Zentrifugation bei 1000 xg für 10 min und 4 °C. Der Überstand enthielt die cytosolischen Proteine. Das Pellet wurde in Puffer 2 resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert, um die membrangebundenen Proteine aus der Membran herauszulösen. Die Kerne wurden mit einer Zentrifugation bei 6000 xg, 10 min und 4 °C von den membrangebundenen Proteinen abgetrennt und in RIPA-Puffer für 30 min auf Eis lysiert. Mit einer weiteren Zentrifugation bei nun 6800 xg wurde die genomische DNA pelletiert und der entstandene Überstand enthielt die nukleären Proteine.

Puffer 1: 50 mM Tris pH 7,7, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, Complete, phosStop, 10 μ M MG132

Puffer 2: wie Puffer 1, jedoch mit zusätzlich 1 % NP-40

RIPA: Zusammensetzung siehe 2.2.4.

2.3.7 Koimmunpräzipitation von Proteinen

Für die Koimmunpräzipitation von myc-Keap1 und TCF11-V5 bzw. Nrf1-V5 wurden Ea.hy926 Zellen (10 cm Schale) mit jeweils 10 μ g der entsprechenden Plasmid-DNAs für 24 h kotransfiziert (siehe 2.2.5.). Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und durch Abschaben von der Platte geerntet. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 500 xg und 4 °C wurden die Zellen in 300 μ l NP-40-Lysepuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis lysiert. Pro IP-Ansatz wurden 250 μ l Lysat mit 250 μ l NP-40-Lysepuffer verdünnt. Die IP erfolgte mit 1 μ g myc Antikörper über Nacht auf dem Rad. Am nächsten Tag folgte nach der Zugabe von Protein-G-Sepharose zum IP-Ansatz eine weitere Stunde Inkubation auf dem Rad. Die Protein-G-Sepharose wurde durch Zentrifugation (560 xg, 1 min, 4 °C) pelletiert und fünfmal mit NP-40-Lyspuffer gewaschen. Im Anschluss wurde die Protein-G-Sepharose in 2 x SDS Probenpuffer aufgekocht und der Überstand über eine SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet.

NP-40-Lysepuffer: 50 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,5 % NP-40, 10 % Glycerol, Complete, phosStop, 10 μ M MG132

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Klonierungsmethoden in *E.coli*

2.4.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur Amplifikation von DNA und zur Einführung von Restriktionsschnittstellen verwendet. Für Standard PCR-Anwendungen wurde das FastStart High Fidelity PCR System (Roche) verwendet und bei Klonierungs-PCR die Pwo SuperYield DNA Polymerase (Roche). In beiden Fällen wurde nach Herstellerangaben gearbeitet. Das Temperaturprogramm wurde entsprechend der Länge der zu amplifizierenden DNA und der Schmelztemperatur der Primer variiert. Das Standardprogramm setzte sich aus folgenden Schritten zusammen:

2 min 95 °C (Denaturierung)
 30 Zyklen a 30 sec 95 °C
 30 sec 53-64 °C (Annealing)
 1-2 min 72 °C (DNA-Polymerisation)
 5 min 72 °C

Die letzte Synthesephase wurde um 5 min verlängert, um mögliche unvollständige Reaktionen zu Ende zu führen. Bei -20 °C wurde die Probe aufbewahrt.

Tab. 2.4: Verwendete Primer für die analytische PCR und Klonierungen (Start- und Stopcodons sind unterstrichen, Schnittstellen fett und Kozak-Sequenzen kursiv hervorgehoben)

Bezeichnung	5'-3' Sequenz	Bemerkung
GAPDH-frwd	ATGGGGAAGGTGAAGGTC	ergibt mit GAPDH-rev ein ca. 1000 bp langes Fragment
GAPDH-rev	TTACTCCTTGGAGGCCATG	
TCF11/Nrf1-frwd	CTAGTGGATGGAGAGACTGG	TCF11: 166 bp; Nrf1: 76 bp
TCF11/Nrf1-rev	GCACTGCTTCTGTTATGCTGG	siehe TCF11/Nrf1-frwd
gp78-frwd	AGACAGCCTCTTCGTGTG	Bindet an Position 301 der gp78 cDNA
gp78-rev	CCAACCACACGTAGATAGTTC	Ergibt mit gp78-frwd ein 660 bp Fragment
TCF11-Kpn1-frwd	CGGGGT ACC ATGCTTTCTCTG AAGAAATACTTAAC	Kpn1-Schnittstelle, ergibt mit TCF11/Nrf1-EcoR1-Flag c-term. Getagtes TCF11
TCF11-EcoR1-Flag-rev	CCG GAATTC <u>TC</u> ACTTGTGCATCGTCGCCT TGTAGTCCTTTCTCCGGTCCTTTGGCTTC	EcoR1-Schnittstelle, siehe TCF11-Kpn1-frwd
TCF11/Nrf1-Xba1-rev	G CTCTAG ACTCTTTCTCCGGTCCTTTGGCTTC	Xba1-Schnittstelle, ergibt mit TCF11-Kpn1-frwd TCF11 bzw. Nrf1 ohne

Bezeichnung	5'-3' Sequenz	Bemerkung
		Stopcodon
TCF11-Nrf1D39-Kpn1-frwd	CGGGGTACCATGGAGATCATCCTGGGG CCC	Kpn1-Schnittstelle, ergibt mit TCF11-Nrf1-Xba1-rev TCF11 bzw. Nrf1 ohne die ersten 39 AS und ohne Stopcodon
Nrf2-BamH1-frwd	GCGGGATCCGCCACCATGATGGACTTGG AGCTGCC	BamH1-Schnittstelle
Nrf2-Kpn1-V5 rev	CCGGGTACCTCAGTAGAATCGAGACCGA GGAGAAGGTTAGGGATAGGCTTACCAATCT AGTTTTTCTTAACATC	Kpn1-Schnittstelle, enthält die Sequenz für V5-Tag, sollte für V5 getagtes Nrf2 dienen, durch Fehler jedoch endogenes Stopcodon im Primer
MafG-BamH1-frwd	CGGGATCCGCCACCATGACGACCCCAATA AAGGAAAC	BamH1-Schnittstelle, ergibt mit MafG-EcoR1-rev-os MafG ohne Stopcodon
MafG-EcoR1-rev-os	CGGAATTCGATCGGGCATCCGTCTTGGAC	BamH1-Schnittstelle, ohne Stopcodon
TEB4-for	CTTTAGAATGGGACCGAGCTGC	Bindet an Position 668 der TEB cDNA
TEB4-rev	GAACAGATATCCAGCCACCAACC	Ergibt mit TEB4-frwd ein 409 bp Fragment
Derlin3-BamH1-for	CGGGATCCATGGCGTGGCAGGGACTAGCGG	BamH1-Schnittstelle
Derlin3-HindIII-rev	CGAAGCTTCTGCTGCGGGGGTGGCAGATGG	HindIII-Schnittstelle Ergibt mit Derlin3-BamH1-for Derlin3 ohne Stopcodon

2.4.1.2 Reinigung der PCR-Produkte

Die Reinigung erfolgte mittels GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) nach Angaben des Produkthandbuches.

2.4.1.3 Restriktion von DNA

Der Klonierungsvektor und die Inserte wurden jeweils mit den gleichen Restriktionsenzymen im dafür vorgesehenen Puffer für etwa 2 Stunden bei 37 °C geschnitten. Wenn es für die Aktivität des Enzyms erforderlich war, wurde zum Reaktionsansatz BSA hinzugefügt. Präparative Ansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl geschnitten, während das Volumen von analytischen Ansätzen nur 20 µl umfasste. Die entstandenen Fragmente wurden anschließend im Agarosegel getrennt.

2.4.1.4 Agarosegelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA wurde ein 1 %iges (w/v; Fragmente grösser als 600 bp) oder 2,5 %iges Agarosegel (w/v; Fragmente kleiner als 600 bp) verwendet.

Gellösung: 1-2,5 % Agarose (w/v)
 150 µg/l Ethidiumbromid
 in 1 x TAE-Puffer

Vor dem Gellauf wurden die DNA-Proben mit dem Probenpuffer versetzt. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte auf einem UV-Leuchttisch bei einer Wellenlänge von 312 nm.

TAE-Puffer: 40 mM Tris, 20 mM NaOAc, 1 mM EDTA

Probenpuffer: 50 % Glycerin (v/v), 50 mM EDTA, 0,25 % Bromphenolblau (w/v)

2.4.1.5 Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel

Das entsprechende DNA-Fragment wurde nach einem Restriktions- oder PCR-Ansatz aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.4.1.6 Ligation

Ligationen wurden in einem Volumen von 20 µl (2 µl 10 x Ligationspuffer, 2 U T4 DNA-Ligase (NEB)) durchgeführt. Dabei wurden die Konzentrationen an Insert variiert, wobei das Insert etwa im 5-fachen molaren Überschuss vorlag. In einer Vektorkontrolle wurde kein Insert eingesetzt, um zu sehen, wie stark der Vektor zur Religation neigte.

Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 16 °C inkubiert.

2.4.1.7 Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli*

Die Transformation wurde mittels Hitzeschock durchgeführt. Zunächst wurden die kompetenten *E.coli*-Zellen (DH5α) auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die kompletten 20 µl des Ligationsansatzes mit den 100 µl kompetenten Zellen gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Für eine Retransformation wurden 0,5 µl Plasmid DNA zu den kompetenten Zellen pipettiert und ebenfalls für eine halbe Stunde auf Eis gestellt. Es folgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C. Im Anschluss an den Hitzeschock wurden die Zellen 2 min auf Eis gestellt, danach in 250 µl SOC-Medium aufgenommen, für 60 min bei 37 °C im Schüttler inkubiert und 50 bzw. 200 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

SOC-Medium: 2 % Bactotrypton, 0,5 % Bacto-Hefe-Extrakt, 20 mM Glucose, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 10 mM NaCl

2.4.1.8 Anzucht von *E.coli*

Die Anzucht von *E.coli* erfolgte in LB-Medium bzw. auf LB-Agar. Zur Selektion auf die plasmidkodierte Ampicillin- oder Kanamycinresistenz von transformierten Bakterien wurden dem Medium 50 mg/l Ampicillin oder 25 mg/l Kanamycin hinzugefügt.

LB-Medium: 1 % Bacto-Trypton (w/v), 0,5 % Bacto-Hefe-Extract (w/v), 171 mM NaCl

Festes Medium enthielt zusätzlich 1,5 % Agar (w/v). Das Medium wurde autoklaviert.

2.4.1.9 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Analyse von Klonen aus der Transformation wurden von LB-Agarplatten Einzelkolonien gepickt und über Nacht in 5 ml LB-Medium bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Die Plasmidisolierung erfolgte nach zwei unterschiedlichen Methoden.

„quick and dirty“ Plasmid-Präparation

2 ml einer *E.coli* Übernachtskultur wurden in einem Eppendorfgefäß bei 8000 rpm für 2 min in der Tischzentrifuge geerntet. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer 1 aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl Puffer 2 hinzugegeben und 4-6 mal durch Umschwenken gemischt. Durch die Zugabe von 350 µl Puffer 3 wurde die Lösung neutralisiert und der ausgefallene Niederschlag wurde für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und zur Fällung der DNA wurden 600 µl Isopropanol zum Überstand gegeben, 5 min bei -20 °C inkubiert und erneut für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde mit 400 µl 70 %iger Ethanollösung gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und anschließend in 50 µl dH_2O aufgenommen. Zum Lösen des Pellets wurde die Plasmid-DNA auf 37 °C erwärmt.

Puffer 1: 50 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 mg/ml RNase A

Puffer 2: 200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS

Puffer 3: 3,0 M KOAc pH 5,0

Die Plasmidisolierung der positiven Klone erfolgte mit dem QIAGEN Spin Kit nach Herstellerangaben.

2.4.1.10 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Für die Amplifizierung von Vektor-DNA im größeren Maßstab wurde eine Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 200 ml LB-Medium wurden mit

2 ml der Kultur beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit.

2.4.1.11 Zielgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA

Die Einführung von spezifischen Mutationen in Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) durchgeführt.

Tab. 2.5: Mutagenese-Primer (hervorgehoben sind die mutierten Basen)

Bezeichnung	5'-3' Sequenz
ARE-17-mut-frwd	AAGGCCTCAAAGCGCGACCAAAGAGCG CT ACAGATCGCTTTAGC
ARE-17-mut-rev	GCTAAAGCG AT CTGT AG CGCTCTTTGGTCGCGCTTTGAGGCCTT
ARE-26-mut-frwd	AAGGCCTCAAAG AG CGAC GGA AGAGCGTGACAGAGCGCTTTACG
ARE-26-mut-rev	CGTAAAGCGCTCTGTACGCTCTT CC GTCGCTCTTTGAGGCCTT
ARE-69-Mut-frwd	GAAGCTACTCCGAGGT CG ACGG CTAA AGGGAAAAGAAAAGTAC
ARE-69-mut-rev	GTACTTTTCTTTTCCCTT TAG CCGTC GAC CTCGGAGTAGCTTC
ARE-135-mut-frwd	GTTTTGTTTGTTGCTTGCCACGCG GG CCAT AG AGTGCTCACTGTCGCAAAA GAAC
ARE-135-mut-rev	GTTCTTTTTCGACAGTGAGCACT CT ATGG CG CGTGGCAAGCAACAAACA AAAC
ARE-590-mut-frwd	CTAAAAGAAATGAAAACATGG GG TGGT AG CTTTAGCCCAAGACTCTCAGG
ARE-590-mut-rev	CCTGAGAGTCTTTGGGCTAAAG CT ACCACCCCATGTTTTCATTTCTTTTAG

2.4.2 Arbeiten mit RNA

2.4.2.1 Gewinnung von RNA aus Säugetierzellen

Die Isolierung von RNA erfolgte mit dem High Pure RNA Isolation Kit (Roche) nach den Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die RNA in H₂O verdünnt und bei 260 nm am Photometer bestimmt. Dabei entsprach eine Absorption von 1,0 einer Konzentration von ca. 50 µg/µl. Um die Korrektheit der Konzentrationsbestimmung zu überprüfen, wurde 1 µg RNA auf ein 1,5 % RNA-Agarose-Gel aufgetragen und die Detektion der RNA erfolgte auf einem UV-Leuchttisch bei einer Wellenlänge von 312 nm.

RNA-Agarose-Gel: 1,5 % Agarose (w/v), 1 x MOPS-Puffer, 6 % Formaldehyd, DEPC-H₂O

10 x MOPS-Puffer: 200 mM MOPS, 50 mM NaoAc, 10 mM EDTA, pH 7.0

2.4.2.2 Herstellung von cDNA

Für die Herstellung von cDNA wurde 1 µg isolierte RNA verwendet. Die cDNA Synthese erfolgte nach dem Handbuch des Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche).

2.4.2.3 Reverse Transkription-PCR (RT-PCR)

Mit Hilfe der RT-PCR wurde das Transkriptionslevel von verschiedenen Genen überprüft. Dazu wurde cDNA mittels PCR vervielfältigt und das Transkriptionslevel mit einem Agarosegel sichtbar gemacht. (PCR siehe 2.4.1.1.)

2.4.2.4 real-time PCR

Für die Durchführung der real-time PCR, wurde cDNA wie unter 2.4.2.2. beschrieben hergestellt. Die real-time PCR wurde in einem Rotor Gene 3000 (Corbett Research) mit Taqman® Primern und Sonden der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Die relativen Expressionslevel der zu untersuchenden Gene wurden gegen die Expression des HPRT1 Gens normalisiert und mittels der $\Delta\Delta CT$ Methode berechnet.

2.4.2.5 Affimetrix Microarray

Für die Analyse der Genexpression mittels microarray wurde RNA isoliert (siehe 2.4.2.1). Sowohl die Hybridisierung der RNA auf einem Human U133 2.0 Plus-Array (Affimetrix) als auch die Datenauswertung erfolgten durch die Firma Signature Diagnostics (Potsdam Deutschland).

2.5 Funktionelle Analysen

2.5.1 CAT-ELISA

Zur Durchführung des CAT-ELISAs wurden 10^5 Ea.hy926 Zellen pro well (24 well) in 500 μ l antibiotikum- und serumhaltigen Medium am Vorabend ausgesät. 0,6 μ g Promotorkonstrukt und 0,1 μ g pcDNA3.1/lacZ wurden mittels Lipofectamin 2000 (Invitrogen) wie unter 2.2.5. beschrieben transfiziert. Die Transfektion erfolgte zunächst für 8 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Nach den 8 h wurden die Zellen entweder mit 100 nM MG132, 10 nM Epoxomicin oder 0,1 % (v/v) DMSO für 16 h behandelt. Für die Überexpression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren wurden unterschiedliche Mengen an Plasmid-DNA dem Transfektionsansatz hinzugefügt. Dabei wurde eine Gesamtmenge an DNA von 0,8 μ g nicht überschritten. Sollte mittels siRNA die Funktion von bestimmten Transkriptionsfaktoren auf die Transkription des PSMB6-Gens untersucht werden, wurden die Zellen 48 h vor der Plasmidtransfektion mit den entsprechenden siRNAs transfiziert. Zur Lyse der Zellen wurden diese zweimal mit kaltem PBS gewaschen und direkt in der Kulturschale mit 100 μ l Lysepuffer für 20 min bei Raumtemperatur lysiert (CAT-ELISA-Kit, Roche). Die Lysate wurden bei 12000 xg für 5 min und 4 °C zentrifugiert. Um die Transfektionseffizienz zu ermitteln wurde die β -Galactosidaseaktivität mit dem High-Sensitivity β -Galactosidase Assay Kit (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers ermittelt. Für den ELISA wurden von jedem Lysat 25 μ l in 200 μ l Probenpuffer (im Kit enthalten) resuspendiert und für den ELISA

verwendet. Die restlichen Schritte des CAT-ELISAs erfolgten nach den Angaben des Handbuchs. Die CAT-Konzentration wurde gegen die β -Galactosidaseaktivität normalisiert.

2.5.2 *In vitro* Expression von Proteinen

Die *in vitro* Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren erfolgte mit Hilfe des TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) in einem Gesamtvolumen von 25 μ l.

2.5.3 Radioaktives Markieren von doppelsträngiger DNA und EMSA

5 μ mol doppelsträngige DNA wurden mit Hilfe der T4 Kinase (Promega) und 25 μ Ci ^{33}P - γ -ATP (Perkin Elmar) für 30 min bei 37 °C an den jeweiligen 5'-Enden radioaktiv markiert. Die markierte DNA wurde von dem überschüssigen ^{33}P - γ -ATP mittels dem nucleotide removal kit (Qiagen) befreit. Die Bindungsreaktion für den EMSA erfolgte für 30 min bei RT mit 10 μ g Kernprotein (siehe 2.3.5.) oder 10 μ l der *in vitro* Translationsansätze (siehe 2.5.2.), 20 fmol radioaktiv markierter DNA und 1 μ g poly dI/dC in Bindungspuffer. Das Endvolumen lag bei 16 μ l. Nach der 30 minütigen Inkubation wurde der komplette Ansatz auf ein natives 5 %iges Polyacrylamidgel in 0,5 x TBE-Puffer aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für etwa 90 min im Kühlraum. Anschließend wurde das Gel auf Filterpapier getrocknet und am Phosphorimager auf mögliche „shifts“ untersucht. Bei den Konkurrenzexperimenten wurde ein 100 molarer Überschuss an spezifischer unmarkierter DNA hinzugegeben.

Bindungspuffer: 25 mM Tris pH 7,5, 75 mM KCl, 1 mM DTT, 0,3 % NP-40, 7,5 % Glycerin, 1 mg/ml BSA

10 x TBE: 890 mM Tris-HCl, 890 mM Borat, 3 mM EDTA

Tab. 2.6: Verwendete Primer für den EMSA (ARE fett hervorgehoben)

Bezeichnung	5'-3' Sequenz
PSMB6-ARE-17-for	AGCGCGACCAAAGAGCGT AGACAGAGCG CTTTACG
PSMB6-ARE-17-rev	CGTAAAGCGCTCTGTACGCTCTTTGGTCGCGCT
PSMB6-ARE-ähnlich-69-for	TCTTTTCCCTTCTGCCGTCAACCTCGGAGTA
PSMB6-ARE-ähnlich-69-rev	TACTCCGAGGTT GACGGCAGA AGGGAAAAGA

2.5.4 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Ungefähr $4,5 \times 10^7$ Ea.hy926 Zellen wurden für 24 h mit 10 nM Epoxomicin oder 0,1 % DMSO behandelt und danach mit Formaldehyd (Endkonzentration 1 %) für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Fixierung wurde durch die Zugabe von Glycin in einer Endkonzentration von 125 mM gestoppt und die Zellen zweimal mit PBS, welches mit 10 μ M PMSF versetzt war, gewaschen. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt, bei 500 xg, 10

min, 4 °C pelletiert, in 2 ml Quelpuffer resuspendiert und für 20 min Eis auf inkubiert. Aufgeschlossen wurden die Zellen durch 10 Hübe in einem Potter und danach bei 2200 xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml SDS-Lyse Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Kerne auf drei Aliquots aufgeteilt und die DNA 10 x bei 25 % power, 100 % cycle für 20 s mit einer MS73 Nadel und einem sonoplus GM70 (Bandelin) auf eine durchschnittliche Länge von 200-1000 bp geschert. Nach jedem Durchgang folgte eine Pause von 30 s. Der komplette Vorgang wurde zum Schutz vor Überhitzung auf Eis durchgeführt. Größere Zelltrümmer und nicht gescherte genomische DNA wurden durch Zentrifugation bei 14000 xg für 10 min und 4 °C abgetrennt. Der Überstand enthielt die Transkriptionsfaktor/DNA-Komplexe und wurde zur Lagerung bei -80 °C aufbewahrt. Pro IP-Ansatz wurden 100 µl des Überstandes verwendet. Dazu wurden diese 1:10 in Verdünnungspuffer verdünnt und mittels Protein-G-Sepharose (GE Healthcare), die mit 1 mg/ml BSA abgesättigt war, für 30 min bei 4 °C auf einem Rad geklärt, um unspezifische Bindung an die Protein-G-Sepharose bei der späteren IP zu verringern. Vom geklärten Überstand wurde 1% als Ausgangs-DNA abgenommen und bei -20 °C aufbewahrt. Der restliche Überstand wurde mit spezifischen Antikörpern gegen die zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren versetzt und über Nacht bei 4 °C auf einem Rad inkubiert. Als Kontrolle diente ein unspezifisches IgG (Cell Signaling). Am nächsten Tag wurde dem Ansatz Protein-G-Sepharose zugesetzt, um die Transkriptionsfaktor/DNA-Komplexe zu präzipitieren. Die Präzipitation erfolgte für 1 h im Kühlraum auf einem Rad. Anschließend wurde die Protein-G-Sepharose zweimal mit Waschpuffer 1, einmal mit Waschpuffer 2, einmal mit LiCl-Waschpuffer und zweimal mit TE-Puffer für 5 min im Kühlraum auf einem Rad gewaschen. Pelletiert wurde die Protein-G-Sepharose jeweils bei 560 xg für 1 min. Die Elution der Transkriptionsfaktor/DNA-Komplexe erfolgte zweimal mit jeweils 200 µl Elutionspuffer bei 65 °C für 15 min. Die beiden Eluate wurden vereint (ca. 400 µl) und die Ausgangs-DNA mit Wasser auf ein Endvolumen von 400 µl aufgefüllt. Zur Trennung der Proteine und der DNA wurden die Ansätze mit 16 µl 5 M NaCl-Lösung versetzt und bei 65 °C über Nacht im Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte die Zugabe von 16 µl 1M Tris pH 6,8, 8 µl 0,5 M EDTA und 0,85 µl Proteinase K (18,7 µg/µl) (Fermentas) und die von der DNA abgetrennten Protein wurden bei 45 °C für 2 h verdaut. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Phenol/Chloroform/Ethanol Präzipitation.

Quelpuffer: 10 mM HEPES pH 7,82, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, complete w/o EDTA, 0,5 µM PMSF

SDS-Lysepuffer: 50 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA, 1 % SDS, complete, 10 µM MG132

Verdünnungspuffer: 16,7 mM Tris pH 8,0, 167 mM NaCl, 1,2 mM EDTA, 1,1 % Triton X-100, 0,01 % SDS, complete, 10 µM MG132

Waschpuffer 1: 20 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS

Waschpuffer 2: 20 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS

LiCl-Waschpuffer: 10 mM Tris pH 8,0, 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 1 % Natriumdesoxycholat

TE-Puffer: 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA

Elutionspuffer: 1 % SDS, 100 mM NaHCO₃ (immer frisch angesetzt)

Tab. 2.7: Verwendete Primer für die Chromatin-Immunpräzipitation

Bezeichnung	5'-3' Sequenz
ChIP-NQO1-for	CAAATTCGTCTCCACGGAGCATG
CHIP-NQO1-rev	CTTTTAGCCTTGGCACGAAATGG
ChIP-PSMC4-ARE204-for	GCCAGAGCTCTGCGAACTTAC
ChIP-PSMC4-ARE204-rev	CAACATAAGCTCATGCGCTGTCC
CHIP-PSMA3-ARE45-for	CCACAATACTCCTCGTCCTGG
ChIP-PSMA3-ARE45-rev	CAAAGGGACGCGTAGGGATTC
ChIP-PSMB6-ARE17-for	GCTTCGCTCCCAGAAGGCC
ChIP-PSMB6-ARE17-rev	GAAACTTCTCGGCTTTCCCAGTC
ChIP-Tub-for	GTCGAGCCCTACAACTCTATC
ChIP-Tub-rev	CCGTCAAAGCGCAGAGAA

2.6 Datenbanken/Programme

Datenbank/Programm

Genom-Datenbank Ensembl

BLAST

ExPASy

NEBcutter V2.0 (NEB)

ClustalW

Oligonucleotide Properties Calculator

MatInspector (Genomatix)

UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>)

ImageJ

2.7 Statistische Analysen

Statistische Auswertungen erfolgten mit dem t-Test des Programms Excel der Firma Microsoft.

3 Ergebnisse

3.1 Regulation der proteasomalen Genexpression

Ein Abfall der proteasomalen Aktivität durch Inhibition des Proteasoms führt zu intrazellulärem Stress. Die Zelle wirkt diesem Ausfall entgegen, indem sie die proteasomalen Gene verstärkt exprimiert und es zur Neubildung von 20S Proteasomen kommt (Meiners et al. 2003).

3.1.1 Proteasominhibition führt zu oxidativem Stress innerhalb der Zelle

Aus Mäusen ist bekannt, dass die proteasomalen Gene bei oxidativem Stress oder nach der Behandlung von Zellen mit Antioxidantien so wie nach Proteasominhibition ebenfalls verstärkt transkribiert werden (Kwak et al. 2003). Daher lag die Frage nahe, ob die Inhibition des Proteasoms zu oxidativem Stress innerhalb der Zelle führen kann und somit die Aktivierung der Transkription möglicherweise der gleichen Regulation unterliegt. Um diese Frage zu beantworten, wurden Zellen mit den verschiedenen Proteasominhibitoren MG132, Epoxomicin, BSc2118 und *clasto*-Lactacystin für 24 h behandelt. Durch Sauerstoffradikale und andere reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle können Carbonylgruppen in die Seitenketten der Proteine eingeführt werden, welche zum Verlust der Proteinfunktion führen können. Diese Carbonylgruppen formen mit 2,4-dinitrophenylhydrazin das 2,4-dinitrophenylhydrazon, welches mittels eines Antikörpers und Immunoblot detektiert werden kann. Abbildung 3.1 zeigt, dass alle getesteten Proteasominhibitoren zu einer Zunahme oxidiert Proteine innerhalb der Zelle führten.

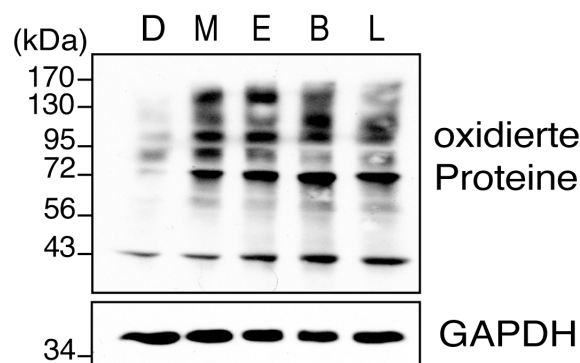


Abb. 3.1: Proteasominhibitoren verursachen eine Akkumulation von oxidierten Proteinen
Ea.hy926 Zellen wurden für 24 h mit den Proteasominhibitoren MG132 (M; 100 nM), Epoxomicin (E; 10 nM), BSc2118 (B; 100 nM) oder *clasto*-Lactacystin (L; 1 µM) behandelt. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO (D) in einer Konzentration von 0,1 %. Die Detektion der oxidierten Proteine erfolgte mit DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazin) und einem gegen DNPH gerichteten Antikörper. GAPDH diente als Ladekontrolle.

3.1.2 Die humanen proteasomalen Promotoren enthalten AREs

Kwak und Mitarbeiter zeigten im Jahr 2003, dass das murine PSMB5 Gen in seinem Promotor AREs besitzt, welche für die Transkription des Gens bei oxidativem Stress erforderlich waren (Kwak et al. 2003). Da die Proteasominhibition ebenfalls zu oxidativem Stress führt, lag die Vermutung nahe, dass die verstärkte Transkription der humanen proteasomalen Gene nach Proteasominhibition sehr wahrscheinlich auch über AREs reguliert wird. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die humanen proteasomalen Promotoren auch AREs besitzen. Es wurden 3000 bp lange Promotorsequenzabschnitte aus den Promotorregionen der α - und Standard- β -Untereinheiten, der ATPasen, der nicht-ATPasen und POMP stromaufwärts vom theoretischen Transkriptionsstart (erste Base des ersten Exons) aus der Gendatenbank Ensembl herausgesucht und mit der Word-basierten Suchfunktion auf mögliche ARE-Sequenzen geprüft. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Es zeigte sich, dass alle humanen proteasomalen Promotoren mindestens ein potentiell ARE in dem analysierten DNA Abschnitt besaßen, welches mit der beschriebenen Konsensussequenz übereinstimmte.

Tab. 3.1: AREs in den Promotoren der humanen proteasomalen Untereinheiten 3000 bp lange Promotorsequenzen der proteasomalen Untereinheiten wurden auf mögliche ARE-Sequenzen geprüft. Aufgelistet sind die gefundenen möglichen AREs auf dem Leit- und dem Folgestrang, die mit der ARE-Konsensussequenz TGANNNGC (Jaiswal 2004) identisch waren.

Gen Name/Untereinheit	Startpunkt der potentiellen ARE-Sequenz (-bp stromaufwärts vom theoretischen Transkriptionsstart)	
	Leitstrang	Folgestrang
α-Untereinheiten		
PSMA1/ α 6	2936	599
PSMA2/ α 2	422,1041	1842
PSMA3/ α 7	45,2540	1842
PSMA4/ α 3	671,1090,1406	1932
PSMA5/ α 5	104	81,205,229,456,476
PSMA6/ α 1	168,429,2082	1298,2035
PSMA7/ α 4	31,51,95	70,2312,2403
β-Untereinheiten		
PSMB1/ β 6	1494,2132,2197,2376,2744	372,1557
PSMB2/ β 4	2128	2830
PSMB3/ β 3	112,1134	285,860,1067,1913,2615
PSMB4/ β 7	1750,2016,2588	110,151
PSMB5/ β 5	1626,2349	200,571
PSMB6/ β 1	17,2627	2711
PSMB7/ β 2	1073	66,594
ATPasen		
PSMC1/Rpt2	2387,2721	449,995
PSMC2/Rpt1	789	-

Startpunkt der potentiellen ARE-Sequenz (-bp stromaufwärts vom theoretischen Transkriptionsstart)		
Gen Name/Untereinheit	Leitstrang	Folgestrang
PSMC3/Rpt5	214,329,1448	226,258,741,1274,1452,2175
PSMC4/Rpt3	204,281,1332	39,962,1912
PSMC5/Rpt6	1910,2079	805,2177,2491
PSMC6/Rpt4	908	-
nicht-ATPasen		
PSMD1/Rpn2	883,920,957,2480,2699,2711	741
PSMD2/Rpn1	1571	-
PSMD3/Rpn3	37,2146,2192	817,2000
PSMD4/Rpn10	792	241,2189,2275
PSMD6/Rpn7	753	1290
PSMD7/Rpn8	1820	691
PSMD8/Rpn12	19,754,2608,2632	866,1521,1493,1992,2373
PSMD11/Rpn6	754,1662,1993	2111,2495
PSMD12/Rpn5	137,428,2363,2502	906
PSMD13/Rpn9	747	1708,1736,2135
PSMD14/Rpn11	889	-
ADRM1/Rpn13	246,2708,2726,2899	1806,2094,2388
Assemblierungshelfer		
POMP	624	303,1278,1936,2729

3.1.3 Genauere Analyse des PSMB6-Promotors

Das PSMB6 Gen wurde exemplarisch ausgewählt, um die Struktur eines Promotors genauer zu untersuchen. Der PSMB6-Promotor besitzt an der Position -17 ein ARE (ARE-17), welches mit der Konsensussequenz an den entscheidenden Basen zu 100 % übereinstimmt. Des Weiteren besitzt dieser Promotor zu der Konsensussequenz ähnliche Sequenzen an den Positionen -26, -69, -135 und -590 (Abb. 3.2A). Die ARE-ähnlichen Sequenzen an den Positionen -69, -135 und -590 besitzen an ihrem 5' Ende das charakteristische TGA-Motiv, welches für die Funktionalität des AREs sehr wichtig ist. Der Unterschied zur Konsensussequenz liegt in der GC Box am 3'Ende. Sie besitzen stattdessen ein AG (-69 & -135) oder AC (-590). Zusätzlich besitzt die ARE-ähnliche Sequenz an Position -69 Ähnlichkeit zum CRE (CRE: TGACGTCA; -69: TGCCGTCA). Das ARE-ähnliche Sequenzmotiv an Position -26 liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zum ARE-17 und hat im Vergleich zur Konsensussequenz einen Basenaustausch an Position 3 (A-G). Dieser Austausch befindet sich in dem wichtigen TGA-Motiv. Eine Analyse der AREs mit dem Programm „genome browser“ zeigte, dass das ARE -17 und die ARE-ähnliche Sequenz an Position -69 evolutionär hoch konserviert sind (Abb. 3.2B,C).

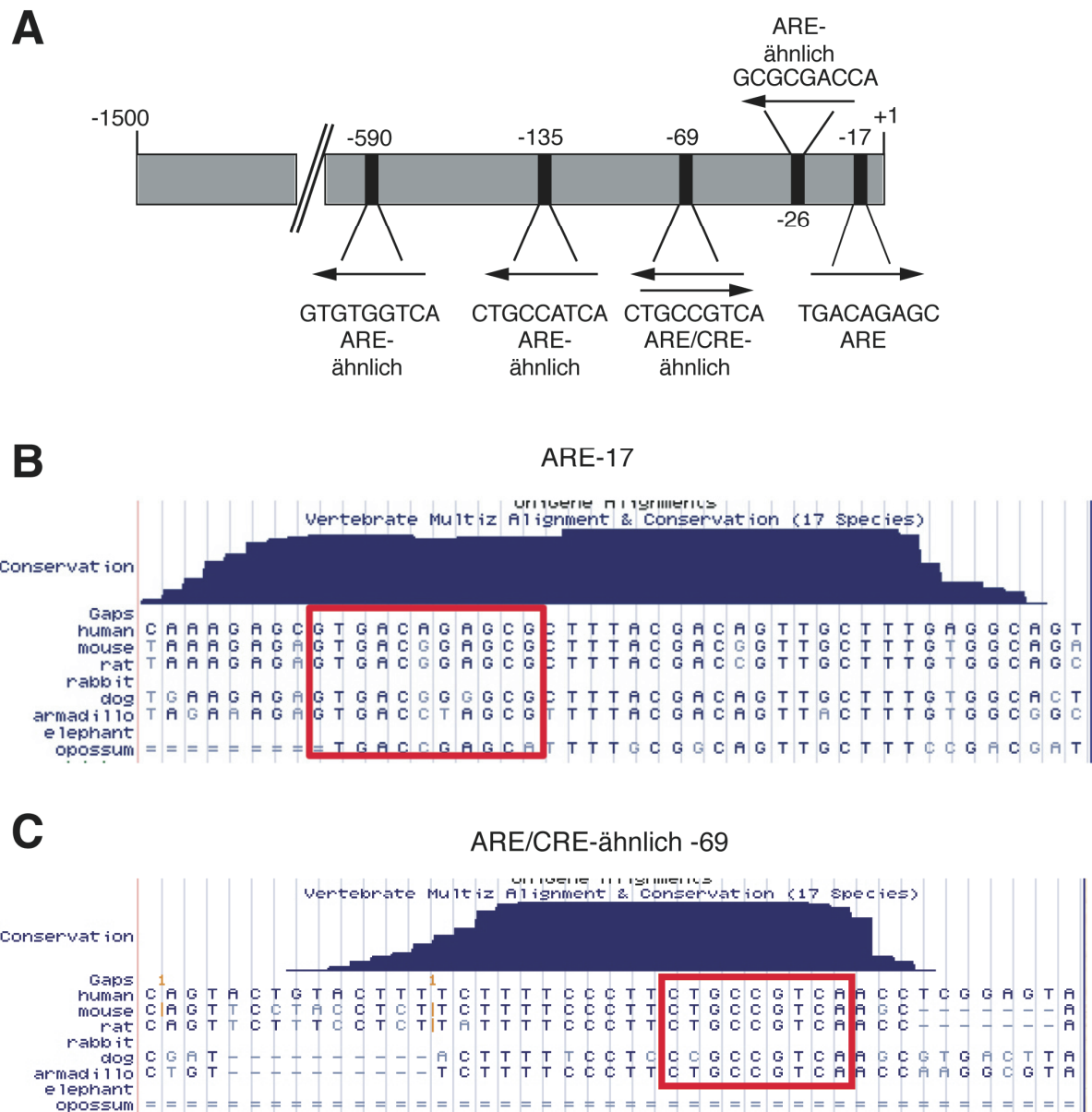


Abb. 3.2: Der PSMB6-Promotor enthält AREs und ARE-ähnliche Sequenzen A) Schematische Darstellung von 1500 Basen des PSMB6-Promotors ausgehend vom theoretischen Transkriptionsstart. Eingezeichnet sind das ARE-17 und die ARE-ähnlichen Sequenzmotive an den Positionen -26, -69, -135 und -590. B) DNA-Sequenzvergleich des ARE-17 (B) und der ARE-ähnlichen Sequenz an Position -69 (C) aus dem humanen PSMB6-Promotor mit denen verschiedener Organismen mittels „genomebrowser“.

3.1.4 Untersuchung der Expression des PSMB6 Gens nach Proteasominhibition mittels eines Reporterassays

Um die Expression des PSMB6 Gens nach Proteasominhibition zu untersuchen, wurden Reporterassays durchgeführt. Als Reportergen diente die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) aus *E. coli*, dessen Expression sich mit einem ELISA nachweisen ließ. Im Labor waren bereits verschiedene Konstrukte vorhanden, die unterschiedliche Längen des PSMB6-Promotors enthielten (Abb. 3.3, Dirk Heyken Dissertation). Mit

zunehmender Länge des Promotors nimmt die Anzahl der enthaltenen ARE-ähnlichen Sequenzen zu. Als Negativkontrolle diente der Leervektor, der keinen Promotor besaß. Für den Reporterassay wurden Ea.hy926 Zellen mit dem Leervektor (pCATbasic) oder den Konstrukten pCAT60, pCAT100 und pCAT1500 transfiziert und anschließend entweder mit 100 nM MG132, 10 nM Epoxomicin oder 0,1 % DMSO für 16 h behandelt. Der Leervektor und das Konstrukt pCAT60 wiesen keine Aktivität auf (Abb. 3.3). Anders verhielt sich das Konstrukt pCAT100. Der 100 Basenpaar lange PSMB6-Promotor wies eine Grundaktivität auf. Diese wurde durch MG132 Behandlung um etwa das 2 fache und durch Epoxomicin um etwa das 2,5 fache gesteigert. Das Konstrukt pCAT1500 besaß überraschenderweise die gleiche Grundaktivität wie das Konstrukt pCAT100. Die Promotoraktivität des pCAT1500 wurde wie beim pCAT100 durch MG132 oder Epoxomicin um etwa das 2 bzw. 2,5 fache gesteigert (Abb. 3.3).

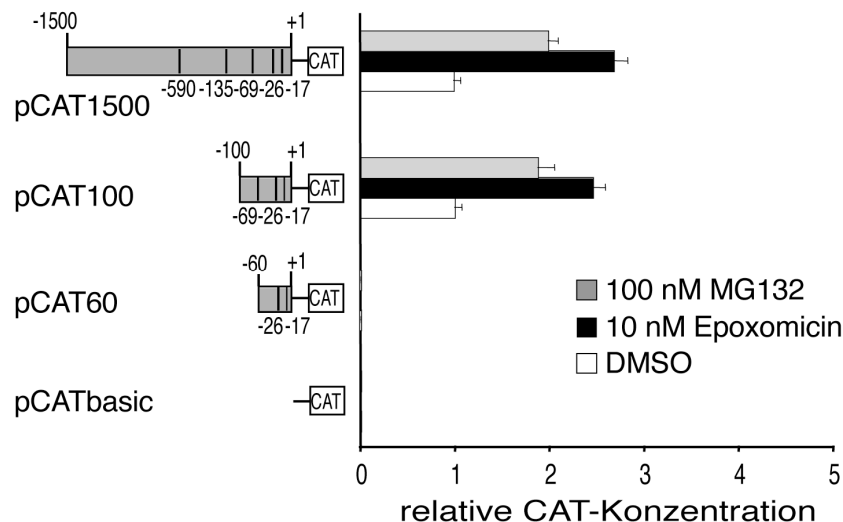


Abb. 3.3: Reporterassay mit verschiedenen PSMB6-Promotorkonstrukten und Proteasominhibition Ea.hy926 Zellen wurden mit je 0,6 µg der verschiedenen PSMB6-Promotorkonstrukte und 0,1 µg pcDNA3.1-lacZ für zunächst 8 h transfiziert. Danach wurden die Zellen für 16 h mit 10 nM Epoxomicin, 100 nM MG132 oder 0,1 % DMSO behandelt. Die Zellen wurden lysiert, die CAT-Menge mittels ELISA bestimmt und auf die β-Galactosidaseaktivität normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit Doppelwerten.

Um den Einfluss der verschiedenen AREs sowohl auf die basale als auch auf die durch Proteasominhibitoren induzierbare Aktivität des PSMB6-Promotor zu analysieren, wurden die AREs im pCAT1500 mutiert. Zur größten Abnahme der basalen PSMB6-Promotoraktivität kam es nach der Mutation des ARE-17 (Mut-17). Hier nahm die Aktivität um ca. 70 % gegenüber dem unmutierten Wildtyp pCAT1500 ab (Abb. 3.4). Des Weiteren konnte diese Aktivität nicht mehr durch Epoxomicin und MG132 gesteigert werden. Die Mutationen der ARE-ähnlichen Sequenzen -135 und -69 (Mut-135 bzw. Mut-69) führten jeweils zur

Reduktion der basalen Aktivität des PSMB6-Promotors, jedoch nicht so stark wie nach Mutation des ARE-17 (Mut-17). Darüber hinaus führten diese Mutationen nicht zum Verlust der Aktivierbarkeit durch Epoxomicin und MG132. Der Unterschied zwischen den Mutationen der ARE-ähnlichen Sequenzen an Position -69 (Mut-69) und -135 (Mut-135) war nur minimal. Die Mutationen der ARE-ähnlichen Sequenzmotive an den Positionen -26 und -590 (Mut-26 bzw. Mut-590) hatten so gut wie keinen Einfluss auf die basale und die durch Proteasominhibitoren induzierbare Aktivität. Diese Konstrukte waren ähnlich aktiv wie das Wildtyp pCAT1500. Lediglich die induzierbare Aktivität wurde durch diese Mutationen etwas herabgesetzt. Zum fast absoluten Aktivitätsverlust kam es durch die Doppelmutation des ARE-17 und der ARE-ähnlichen Sequenz an Position -69 (Mut-17/-69). Wie erwartet, kam es bei der Doppelmutation (Mut -17/-69) durch die Proteasominhibition nicht zur Aktivitätszunahme, da das ARE-17 mutiert war und dieses den größten Einfluss auf die Induzierbarkeit des PSMB6-Promotors durch Proteasominhibitoren besaß.

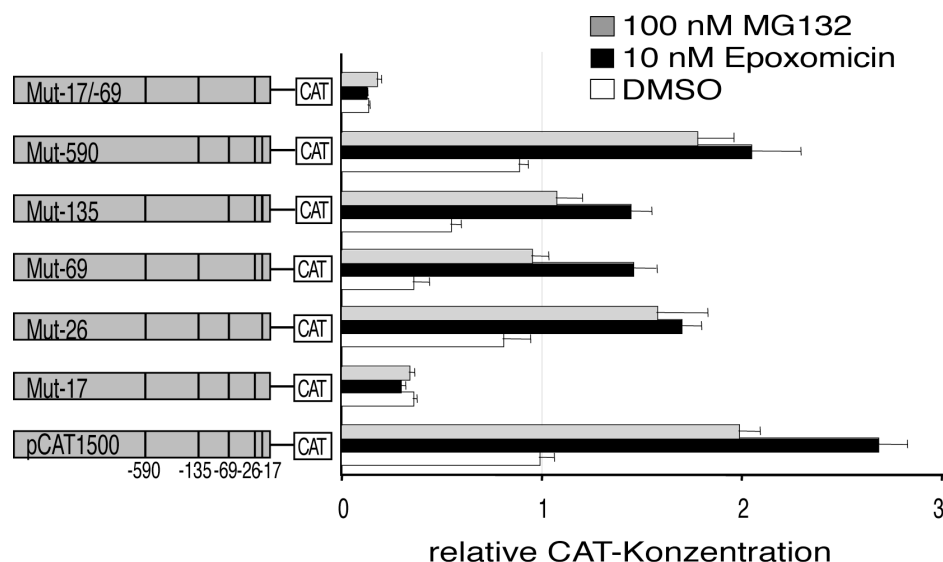


Abb. 3.4: Reporterassay mit dem Wildtyp pCAT1500 Promotorkonstrukt und pCAT1500 Mutationskonstrukten Ea.hy926 Zellen wurden mit dem Wildtyp pCAT1500 Promotorkonstrukt oder Mutationskonstrukten, in denen das ARE-17 oder die ARE-ähnlichen Sequenzen mutiert waren, für 8 h transfiziert und anschließend für 16 h mit 10 nM Epoxomicin oder 100 nM MG132 behandelt. Mittels eines ELISAs wurde die CAT-Menge bestimmt und diese auf die β -Galactosidaseaktivität normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit Doppelwerten.

3.1.5 Verstärkte Bindung von nukleären Proteinen an das ARE-17 nach Proteasominhibition

In den durchgeführten Reporterassays wurde deutlich, dass das ARE-17 den größten Einfluss sowohl auf die basale als auch auf die durch Epoxomicin bzw. MG132 induzierbare Aktivität des PSMB6-Promotors besaß. Aus diesem Grund wurde dieses ARE im EMSA

verwendet, um zu untersuchen, ob die Inhibition des Proteasoms zu einer verstärkten Bindung von nukleären Proteinen an das ARE-17 führt. Unter Kontrollbedingungen (DMSO) kam es zur Bindung von nukleären Proteinen an das ARE-17 (Abb. 3.5A). Dabei war auffällig, dass mindestens zwei Protein/DNA Komplexe entstanden sein mussten. Die Bindung der nukleären Proteine an das ARE-17 war spezifisch, da ein 100 facher Überschuss an unmarkiertem ARE-17 die Bindung an das radioaktiv markierte aufhob. Wie vermutet, führte die Proteasominhibition durch Epoxomicin zur verstärkten Bindung an das ARE-17 gegenüber der DMSO Kontrolle, da die Signalstärke, die ein Maß für die Bindung ist, deutlich zunahm. Das bekannte Antioxidant *tert*-Butylhydrochinon führte hingegen zu keiner vermehrten Proteinbindung an das ARE-17. Im Gegensatz zum ARE-17 kam es an der ARE-ähnlichen Sequenz an Position -69 nicht zur verstärkten Bindung von nukleären Proteinen durch die Proteasominhibition. Die Bindung an dieses ARE war bei den drei untersuchten Bedingungen identisch (Abb. 3.5B).

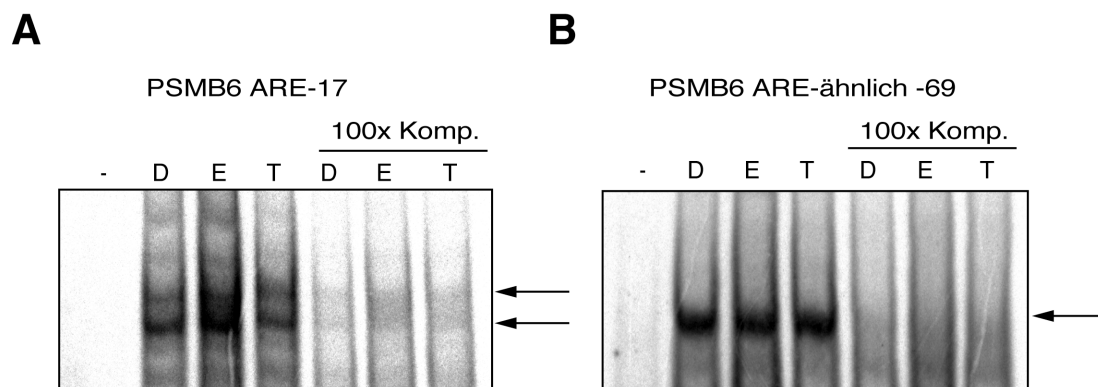


Abb. 3.5: Electrophoretic Mobility Shift Assay mit dem PSMB6 ARE-17 und der ARE-ähnlichen Sequenz an Position -69 Die Proteasominhibition mit Epoxomicin führt zu einer erhöhten Bindung nukleärer Proteine an das ARE-17. Hingegen nahm die Proteinbindung an der ARE-ähnlichen Sequenz an Position -69 nicht zu. A) Ea.hy926 Zellen wurden mit DMSO (D), Epoxomicin (E; 10 nM) und *t*-BHQ (T; 100 μ M) für 24 h behandelt. Danach wurden die nukleären Proteine von den nicht-nukleären getrennt. 10 μ g Kernextrakt wurden mit 20 fmol radioaktiv markiertem PSMB6 ARE-17 (A) oder PSMB6 ARE-ähnlich-69 (B) Oligonukleotid für 30 min bei RT inkubiert. In Wettbewerbsversuchen wurde dem Reaktionsansatz ein 100 facher Überschuss unmarkierter Oligonukleotide zugesetzt. Der komplette Reaktionsansatz wurde mit einem 5 %igem Polyacrylamid Gel in 0,5 x TBE aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und am Phosphorimager vermessen. Die spezifischen DNA-Protein-Komplexe sind durch Pfeile gekennzeichnet.

3.1.6 Die verwendete Epoxomicin Konzentration war nicht toxisch

Proteasominhibitoren lösen in zu hohen Dosen Apoptose innerhalb der Zelle aus (Meiners et al. 2006). Um sicher zu sein, dass die verwendeten Dosen nicht toxisch für die Zellen waren, wurde die Zellproliferation mittels eines MTT-Assays bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass sowohl DMSO als auch 10 nM Epoxomicin - verglichen mit vollkommen unbehandelten Zellen - keinen Einfluss auf die Zellproliferation hatten (Abb. 3.6). Eine Behandlung mit 0,5 %

NP-40 führte wie erwartet zum Tod der Zellen. Demnach war eine Behandlung von Zellen mit einer Konzentration von 10 nM über einen Zeitraum von 24 h nicht toxisch. Im MTT-Assay wurde nur die Toxizität von Epoxomicin bestimmt, da im weiteren Verlauf nur noch Epoxomicin verwendet wurde, weil dieses im Vergleich zu MG132 zu einer stärkeren Expression der proteasomalen Gene führte (Abb. 3.3).

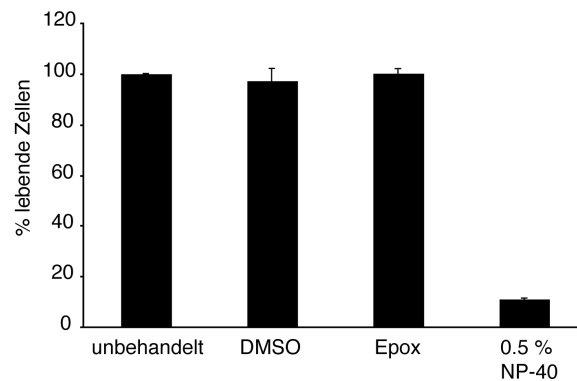


Abb. 3.6: Überprüfung der Zellproliferation nach Epoxomicin Behandlung mittels MTT-Assay
Ea.hy926 Zellen wurden mit 0,1 % DMSO oder 10 nM Epoxomicin für 24 h behandelt. Als weitere Kontrollen dienten vollkommen unbehandelte oder mit 0,5 % NP-40 behandelte Zellen.

3.1.7 Die Überexpressionen von TCF11, Nrf2 und c-Jun führen zur Aktivierung des PSMB6-Promotors

Durch die vorangegangenen Versuche wurde deutlich, dass die Transkription der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition über AREs reguliert wird. In der Literatur ist beschrieben, dass der Transkriptionsfaktor Nrf2 die Transkription der murinen proteasomalen Gene bei oxidativem Stress über AREs aktiviert und dass der Transkriptionsfaktor c-Jun alleine oder zusammen mit Nrf2 an AREs binden kann (Venugopal and Jaiswal 1998; Kwak et al. 2003; Levy et al. 2009). Darüber hinaus beschrieb das Programm MatInspector der Firma Genomatix, welches DNA-Sequenzen nach möglichen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren analysiert, das ARE-17 als Bindestelle für das Dimer aus TCF11 und MafG. Zudem ist für TCF11 ebenfalls bekannt, dass es an AREs binden kann (Myhrstad et al. 2001). Um die Einflüsse von Nrf2, c-Jun und TCF11 auf die Transkription des humanen PSMB6 Gens zu untersuchen, wurden Überexpressionsversuche durchgeführt. Dazu wurden Ea.hy926 Zellen zusätzlich zum pCAT1500 entweder mit dem Leervektor oder mit verschiedenen Mengen von Nrf2, c-Jun bzw. TCF11 Expressionsplasmiden kotransfiziert. Wie in Abbildung 3.7A gezeigt, führte die Überexpression von Nrf2 bzw. c-Jun zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung des PSMB6-Promotors. Die Reportergenexpression wurde maximal um das 3 fache gesteigert (Abb. 3.7A). Im Gegensatz dazu resultierte die Überexpression von TCF11 bei gleicher

Plasmidmenge in einer 15-fach erhöhten Expression des Reportergens. Somit war TCF11 in der Lage, den PSMB6-Promotor sehr viel stärker zu aktivieren.

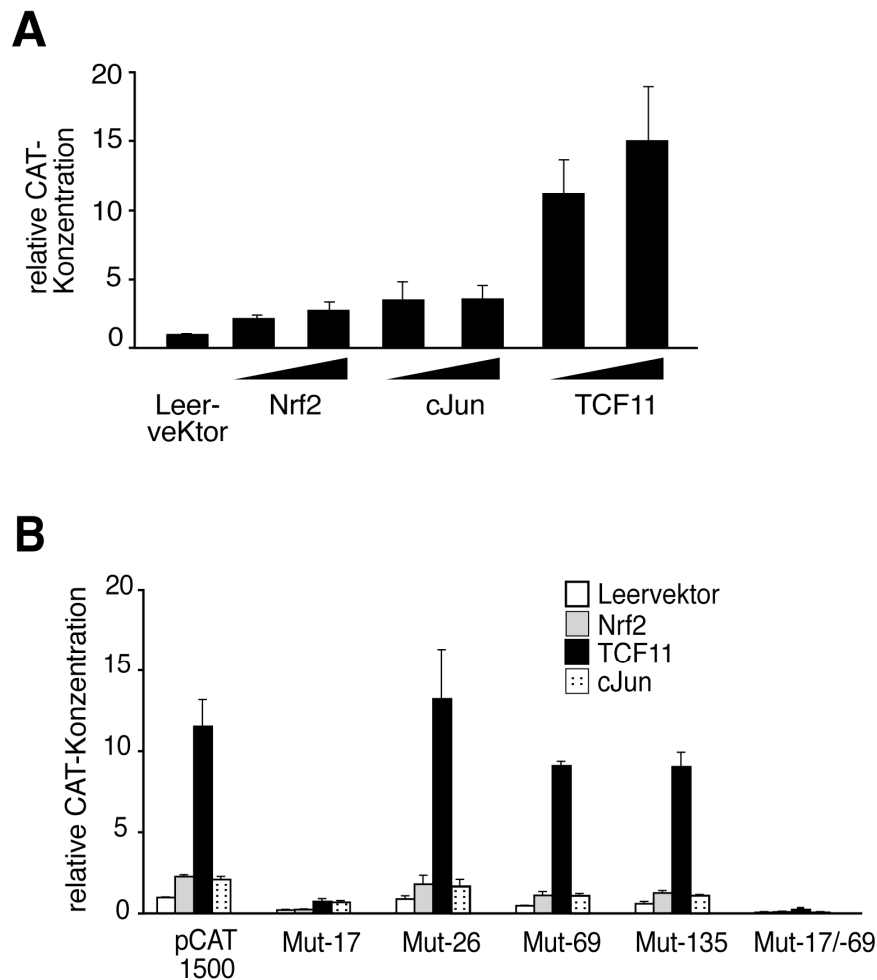


Abb. 3.7: Reporterassay mit Überexpression von Nrf2, c-Jun und TCF11 A) Ea.hy926 Zellen wurden mit 0,6 µg Reporterkonstrukt pCAT1500, verschiedenen Mengen an Nrf2 c-Jun oder TCF11 Plasmiden (0,025 µg, 0,05 µg) und 0,1 µg pcDNA3.1-lacZ kotransfiziert. Nach 24 h wurde die CAT-Konzentration mit Hilfe eines ELISAs ermittelt und diese auf die β -Galactosidaseaktivität normiert. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit Doppelwerten. B) 0,6 µg des Wildtyp pCAT1500 oder 0,6 µg von den Mutationskonstrukten wurden mit 0,05 µg Nrf2, c-Jun oder TCF11 Plasmid und 0,1 µg pcDNA3.1-lacZ in Ea.hy926 Zellen kotransfiziert. Der Rest erfolgte so wie unter A beschrieben.

Als nächstes sollte getestet werden, wie sich die verschiedenen Mutationen der AREs auf die Expression des Reportergens nach Überexpression von Nrf2, c-Jun und TCF11 auswirken. Die Mutation des ARE-17 (Mut-17) hatte wie erwartet den größten Einfluss auf die basale Expression des Reportergens (Abb. 3.7B), da diese gegenüber dem Wildtyp pCAT1500 wieder deutlich abnahm. Die Überexpression von Nrf2 führte beim Mut-17 nicht zur Aktivierung der Transkription des Reportergens, da es im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle keinen Unterschied gab. Ebenso führte die Mutation des ARE-17 dazu, dass der

PSMB6-Promotor durch TCF11 nur noch sehr schwach aktiviert wurde. Durch die Überexpression von c-Jun wurde der PSMB6-Promotor mit mutiertem ARE-17 (Mut-17) immer noch um den Faktor 2,3 aktiviert (Abb. 3.7B). Die Mutation der ARE-ähnlichen Sequenz an Position -26 hatte nach den Überexpressionen von Nrf2, c-Jun und TCF11 verglichen mit dem pCAT1500 keinen Einfluss auf die Expression des Reportergens. Die basalen Aktivitäten der Konstrukte Mut-69 bzw. Mut-135 waren verglichen mit dem pCAT1500 reduziert. Durch die Überexpression von Nrf2, c-Jun und TCF11 kam es bei beiden Konstrukten zur Steigerung der Aktivitäten, jedoch waren die Aktivitäten verglichen mit dem pCAT1500 reduziert. Das Doppelmutationskonstrukt Mut-17/-69 zeigte sowohl nach Transfektion mit dem Leervektor als auch mit Nrf2, c-Jun und TCF11 so gut wie keine Expression des Reportergens.

3.1.8 TCF11 und Nrf2 binden *in vitro* jeweils als Dimer mit MafG an das ARE-17

Die Mutation des ARE-17 führte dazu, dass Nrf2 und TCF11 den PSMB6-Promotor nicht mehr transkriptionell aktivieren konnten (Abb. 3.7B). Dagegen reduzierte die Mutation nicht die c-Jun vermittelte Expression. Deshalb sollte untersucht werden, ob TCF11, Nrf2 und c-Jun an das ARE-17 binden können. Dafür wurden die einzelnen Transkriptionsfaktoren im Retikulozytenlysat *in vitro* synthetisiert und die Bindung an radioaktiv markierte Oligonukleotide, die die Sequenz des ARE-17 enthielten, in EMSA Experimenten überprüft. TCF11 war nicht in der Lage als Monomer oder als Homodimer an das ARE-17 zu binden (Abb. 3.8A). Stattdessen kam es zu einer Bindung, wenn TCF11 zusammen mit seinem beschriebenen Bindungspartner MafG exprimiert wurde. Analog dazu konnte Nrf2 auch nicht allein, sondern nur als Heterodimer mit MafG an das ARE-17 binden. Wurde MafG allein *in vitro* exprimiert kam es ebenfalls zu keiner Bindung an das ARE-17. Venugopal und Mitarbeiter zeigten, dass c-Jun mit Nrf2 und Nrf1, einer Isoform von TCF11, an AREs binden kann (Venugopal and Jaiswal 1998). Daher wurde c-Jun allein oder in Kombination mit Nrf2, TCF11 und MafG *in vitro* koexprimiert. Jedoch resultierte weder die alleinige noch die Koexpression mit einem der anderen Transkriptionsfaktoren in einem veränderten Migrationsverhalten der Oligonukleotide (Abb. 3.8B). Somit ist festzuhalten, dass TCF11 und Nrf2 als Heterodimer mit MafG an das ARE-17 binden können. c-Jun kann dies jedoch nicht. Dies ist somit eine Bestätigung der Mutationsexperimente (Abb. 3.7B).

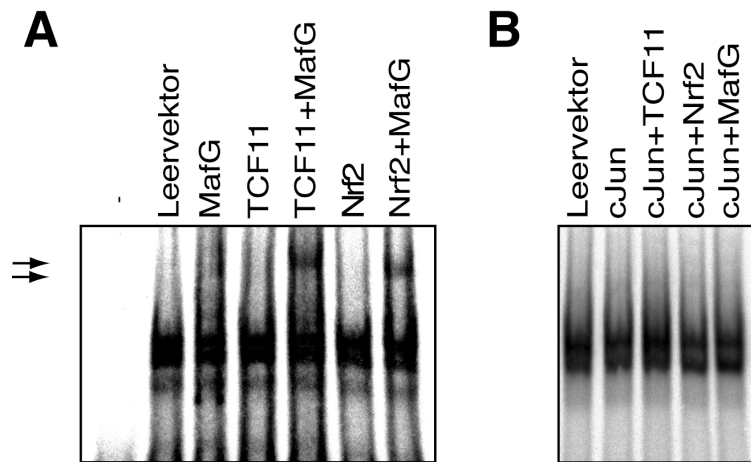


Abb. 3.8: TCF11 bzw. Nrf2 binden als Heterodimer mit MafG an das ARE-17 A) TCF11, Nrf2 und MafG wurden allein oder in den angegebenen Kombinationen im Retikulozytenlysats *in vitro* exprimiert, mit radioaktiv markiertem PSMB6-ARE-17 Oligonukleotid für 30 min bei RT inkubiert und über ein 5 % Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und die Detektion der DNA-Protein-Komplexe erfolgte am Phosphorimager. B) Wie unter A beschrieben, jedoch wurde c-Jun allein oder in Kombination mit TCF11, Nrf2 oder MafG *in vitro* exprimiert.

3.1.9 Die Überexpression von TCF11 aktiviert die Transkription von endogenen proteasomalen Genen und führt zu neu assemblierten Proteasomkomplexen

Durch die Reporterassays wurde deutlich, dass TCF11 ein stärkerer Aktivator der Transkription des PSMB6 Gens ist als Nrf2 und c-Jun. Da Reporterassays nicht genau die *in vivo* Situation widerspiegeln, wurden Zellen mit Expressionsplasmiden für TCF11, Nrf2 und c-Jun transfiziert und anschließend die Expressionslevel von vier endogenen repräsentativen proteasomalen Genen (PSMA2, PSMB6, PSMB4, PSMC4) mittels real-time PCR analysiert. Jedes der vier Gene wurde durch die Überexpression von TCF11 moderat vermehrt transkribiert, was sich in höheren mRNA Mengen im Vergleich zur Kontrolle (Leervektor) ausdrückte (Abb. 3.9A). Die größte Steigerung war bei der Transkription des PSMC4 Gens zu beobachten. Hier resultierte die Überexpression von TCF11 in einer um das 2,5 fache gesteigerten Transkription. Im Gegensatz dazu hatten die Überexpressionen von Nrf2 und c-Jun keinen Einfluss auf die Transkription der vier getesteten endogenen proteasomalen Gene. Die erhöhten mRNA Level der proteasomalen Gene, hervorgerufen durch die Überexpression von TCF11, müssen jedoch nicht in jedem Fall zu einer gesteigerten Synthese dieser Untereinheiten führen. Es besteht die Möglichkeit, dass die mRNA schnell wieder abgebaut wird, ohne dass diese zur Translation genutzt wird. Des Weiteren bedeutet ein erhöhter Pool an freien proteasomalen Untereinheiten nicht, dass diese sich auch zu den verschiedenen Proteasomkomplexen assemblieren. Mit Hilfe der radioaktiven metabolischen Markierung von Zellen und der anschließenden

Immunpräzipitation von neu assemblierten 20S Proteasomen sollte dies analysiert werden. Dabei wurde deutlich, dass die erhöhte Transkription der proteasomalen Gene durch die Überexpression von TCF11 auch zu einer gesteigerten Translation der 20S Untereinheiten mit gleichzeitiger Assemblierung von neuen 20S Proteasomen führte (Abb. 3.9B). Die Menge an neu assemblierten 20S Proteasomen war gegenüber der Kontrolle (Leervektor) um das 2 fache erhöht. Wie anhand der real-time PCR Ergebnisse zu erwarten war, führten die Überexpressionen von Nrf2 und c-Jun nicht zu neu assemblierten 20S Proteasomen (Abb. 3.9B). Eine weitere Möglichkeit herauszufinden, ob ein Mehr an mRNA auch zu einem Mehr an Protein führt, basiert auf der Bestimmung der Menge eines Proteins. Um die Mengen von den verschiedenen Proteasomkomplexen zu bestimmen, wurden Totallysate aus Ea.hy926 Zellen, die entweder mit einem Leervektor oder einem Expressionsplasmid für die Überexpression von TCF11 transfiziert waren, auf einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt und geblottet. Anschließend wurden die Mengen der verschiedenen Proteasomkomplexe mittels Immunoblot analysiert. Der Immunoblot mit einem Antikörper gegen die proteasomale $\alpha 6$ -Untereinheit zeigte, dass es drei verschiedene Proteasomkomplexe gab (Abb. 3.9C). Zusätzlich wurde deutlich, dass die Mengen aller drei Proteasomkomplexe erhöht waren, wenn TCF11 überexprimiert wurde. Zwei der Proteasomkomplexe waren mit dem Proteasomaktivator PA28 assoziiert, wie ein Antikörper gegen PA28 β zeigte (Abb. 3.9C). Ein Antikörper gegen die Rpn2 Untereinheit des 19S Regulatorkomplexes erkannte ebenfalls wie der $\alpha 6$ Antikörper drei Proteinkomplexe, von denen zwei auf den gleichen Höhen migrierten, wie zwei der Proteasomkomplexe, die durch den $\alpha 6$ Antikörper erkannt wurden. Bei diesen beiden Komplexen handelte es sich vermutlich um das 30S Proteasom und um das so genannte Hybridproteasom. Allerdings lassen sich das Hybrid- und das 26S Proteasom im nicht-denaturierenden Gel schwer voneinander trennen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass in Ea.hy926 Zellen auch das 26S Proteasom vorhanden ist und dessen Menge ebenfalls nach TCF11 Überexpression erhöht war. Der kleinste durch den Rpn2 Antikörper erkannte Komplex konnte keinem Proteasomkomplex zugeordnet werden, da dieser nicht die $\alpha 6$ -Untereinheit enthielt. Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die Ea.hy926 Zellen keine freien 20S Proteasomen besaßen, sondern nur 20S Proteasomen, die entweder mit dem Proteasomaktivator PA28 oder mit dem 19S Regulatorkomplex assoziiert waren. Zusätzlich gab es noch das Hybrid- und das 30S Proteasom. Die Mengen aller Proteasomkomplexe nahmen durch die Überexpression mit TCF11 zu. Die Bestimmung der Enzymaktivität im Nativgel zeigte, dass die erhöhten Level der Proteasomkomplexe, die durch die Überexpression von TCF11 zustande kamen, zu einer gesteigerten proteolytischen Aktivität

fürten (Abb. 3.9D). Durch die Überexpression von TCF11 nahm die zelluläre Menge des Assemblierungshelferproteins POMP eindeutig ab (Abb. 3.9E).

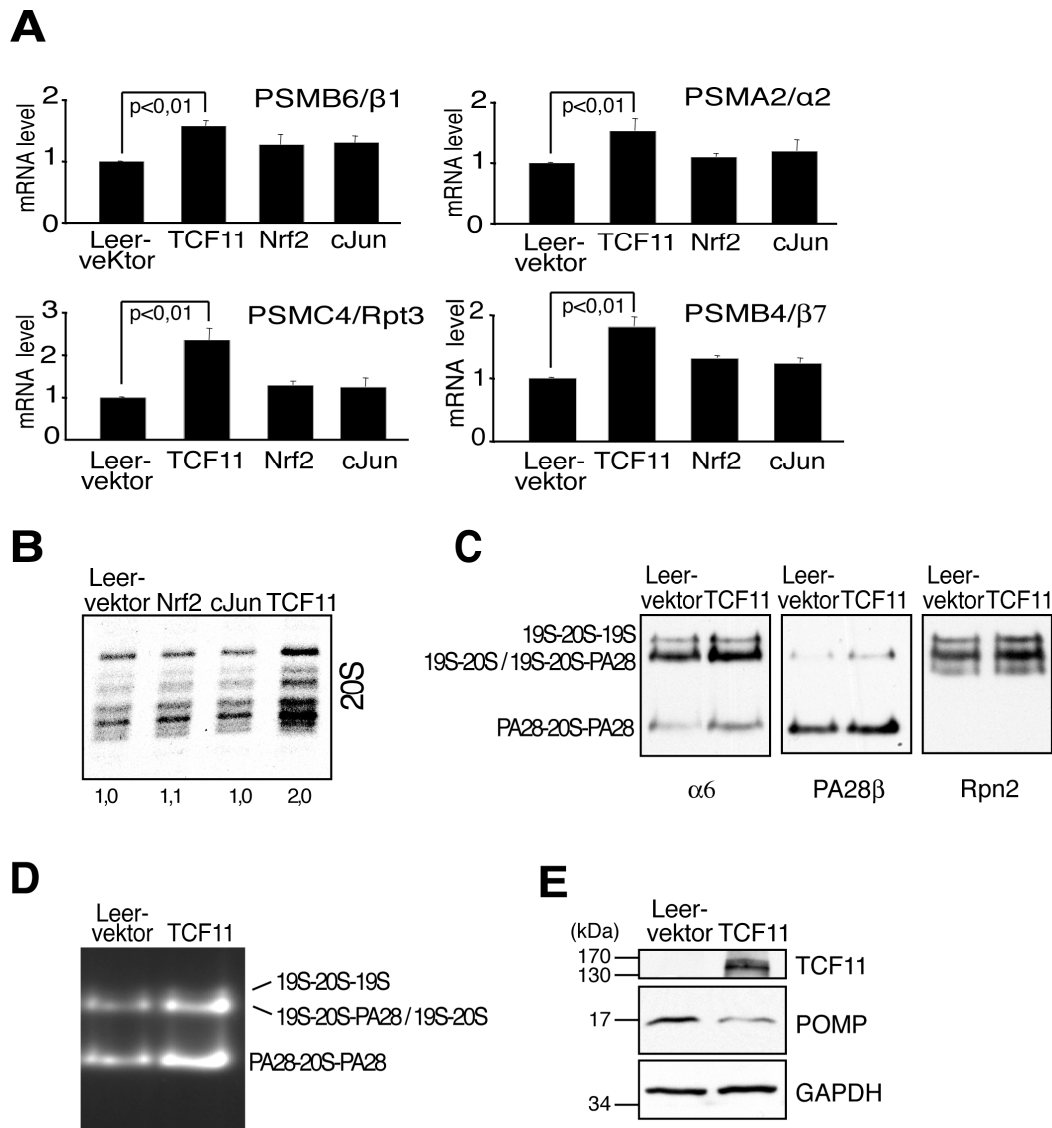


Abb. 3.9: Die Überexpression von TCF11 führt zu einer gesteigerten Expression der proteasomalen Gene und zu neu assemblierten Proteasomkomplexen A) In Ea.hy926 Zellen wurden Nrf2, c-Jun oder TCF11 für 24 h überexprimiert und anschließend wurden die Expressionen der proteasomalen Gene PSMB6, PSMA2, PSMC4 und PSMB4 mittels real-time PCR analysiert. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten (n=3). B) Ea.hy926 Zellen wurden nach einer 24 stündigen Überexpression von Nrf2, c-Jun oder TCF11 radioaktiv metabolisch markiert. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert, das 20S Proteasom mit einem Antikörper gegen die α6-Untereinheit immunpräzipitiert und mit einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion der neu assemblierten 20S Proteasomen erfolgte durch Autoradiographie. C) TCF11 wurde in Ea.hy926 Zellen für 24 h überexprimiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und das Komplettlysate auf ein nicht-denaturierendes Gel aufgetragen. Die verschiedenen Proteasomkomplexe wurden durch einen Immunoblot mit Antikörpern gegen α6, PA28β und Rpn2 sichtbar gemacht. D) Die Aktivitätsmessung der Proteasomkomplexe erfolgte durch einen Substrat „overlay“ mit dem fluorogenen Peptid Suc-LLVY-AMC (200 μM). E) Die Lysate aus C wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Detektion von TCF11, POMP und GAPDH erfolgte mittels Immunoblot.

Um eine generellere Aussage über die Transkription der Gene für die proteasomalen Untereinheiten, der Assemblierungshelfer und von Proteasom assoziierten Proteinen nach TCF11 Überexpression zu erhalten, wurden die Expressionslevel dieser Gene mittels microarray bestimmt. Der Schwellenwert für eine signifikante Steigerung der Transkription wurde auf 1,2 festgesetzt. Durch die Überexpression von TCF11 waren die Transkriptionen der Gene für die meisten α - und Standard- β -Untereinheiten, für die ATPasen, für die nicht-ATPasen, für POMP, ECM29 (KIAA0368) und PA200 (PSME4) erhöht (Tab. 3.2). Eine Ausnahme waren die Gene PSMB3 und PSMD2. Die Transkriptionen dieser Gene waren nicht gesteigert. Ebenso unverändert waren die Transkriptionen der Gene für die Immuno- β -Untereinheiten PSMB8, PSMB9, PSMB10 und die der Gene PSME1-3. Die Gene PSME1-3 codieren für die Proteine PA28 α,β,γ . Auffällig war, dass die Expressionen der Assemblierungshelfer des 20S Proteasoms PAC1-4 (PSMG1-4) und die des 19S Regulatorkomplexes S5b, p27 und p28 (PSMD5, PSMD9 und PSMD10) unverändert waren. Fast annähernd gleiche Genexpressionen wie nach TCF11 Überexpression wurden nach der Behandlung von Zellen mit 10 nM Epoxomicin beobachtet. Es wurden ebenfalls die meisten α - und Standard- β -Untereinheiten, ATPasen, nicht-ATPasen, POMP (POMP), ECM29 (KIAA0368) und PA200 (PSME4) verstärkt exprimiert (Tab. 3.2). Jedoch nahmen die Expressionen der Immuno- β -Untereinheiten, von PA28 α,β,γ und die der Assemblierungshelfer PAC1-4, S5b, p27 und p28 ab anstatt gleich zu bleiben. Allerdings wurde deutlich, dass die Überexpression von TCF11 und die Proteasominhibition durch Epoxomicin zu einem sehr ähnlichen Expressionsmuster führten. Somit ist TCF11 sehr wahrscheinlich für die Transkription der proteasomalen Gene und der Gene für POMP, PA200 bzw. ECM29 nach Proteasominhibition verantwortlich.

Tab. 3.2: Die Überexpression von TCF11 führt zu einer verstärkten Transkription der 32 proteasomalen Gene In Ea.hy926 Zellen wurde entweder TCF11 für 24 h überexprimiert oder die Zellen wurden für 24 h mit 10 nM Epoxomicin behandelt. Aus den Zellen wurde die RNA isoliert und die Expressionen der proteasomalen Gene, der Assemblierungshelfer und Proteasom assoziierter Proteine mittels eines Human U133 2.0 Plus microarrays (Affimetrix) analysiert.

fache Zunahme der Transkription

Gen Name/Protein Name	TCF11 Überexpression	10 nM Epoxomicin
α-Untereinheiten		
PSMA1/ α 6	1.2	1.3
PSMA2/ α 2	1.4	1.4
PSMA3/ α 7	1.2	1.4
PSMA4/ α 3	1.3	1.2
PSMA5/ α 5	1.3	1.2
PSMA6/ α 1	1.2	1.1
PSMA7/ α 4	1.4	1.1

Gen Name/Protein Name	fache Zunahme der Transkription	
	TCF11 Überexpression	10 nM Epoxomicin
β-Untereinheiten		
PSMB1/β6	1.2	1.1
PSMB2/β4	1.4	1.3
PSMB3/β3	1.1	1.3
PSMB4/β7	1.2	1.5
PSMB5/β5	1.2	1.3
PSMB6/β1	1.3	1.1
PSMB7/β2	1.4	1.4
PSMB8/iβ5	1.1	0.3
PSMB9/iβ1	1.1	0.4
PSMB10/iβ2	1.0	0.4
19S Regulatorkomplex (ATPasen)		
PSMC1/Rpt2	1.2	1.3
PSMC2/Rpt1	1.6	1.4
PSMC3/Rpt5	1.2	1.0
PSMC4/Rpt3	1.5	2.0
PSMC5/Rpt6	1.2	1.4
PSMC6/Rpt4	1.3	1.4
19S Regulatorkomplex (nicht-ATPasen)		
PSMD1/Rpn2	1.5	1.4
PSMD2/Rpn1	1.1	1.6
PSMD3/Rpn3	1.2	1.8
PSMD4/Rpn10	1.2	1.1
PSMD6/Rpn7	1.3	1.5
PSMD7/Rpn8	1.3	1.5
PSMD8/Rpn12	1.3	1.2
PSMD11/Rpn6	1.3	2.4
PSMD12/Rpn5	1.5	1.6
PSMD13/Rpn9	1.3	2.0
PSMD14/Rpn11	1.4	1.4
ADRM1/Rpn13	1.3	1.2
andere Regulatoren		
PSME1/PA28 α	1.0	0.7
PSME2/PA28 β	1.1	0.7
PSME3/PA28 γ	0.9	0.9
PSME4/PA200	1.3	2.0
KIAA0368/ECM29	1.3	1.7
Assemblierungshelfer		
20S Proteasom		
PSMG1/PAC1	1.0	0.7
PSMG2/PAC2	0.9	0.7
PSMG3/PAC3	1.1	0.6

Gen Name/Protein Name	fache Zunahme der Transkription	
	TCF11 Überexpression	10 nM Epoxomicin
PSMG4/PAC4	1.1	0.5
POMP	1.6	1.7
19S Regulatorkomplex		
PSMD5/S5b	1.0	1.0
PSMD9/p27	1.1	1.0
PSMD10/p28	1.1	0.9

3.1.10 TCF11, Nrf2 und c-Jun akkumulieren nach Proteasominhibition im Zellkern

Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression von Genen über die Bindung an bestimmte Regionen in der DNA, wodurch die Bindung der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie verbessert wird (Fuda et al. 2009). Damit die Transkription von bestimmten Genen verstärkt stattfinden kann, muss die Menge des Transkriptionsfaktors, der diese Gene reguliert, im Zellkern erhöht sein, da so die Wahrscheinlichkeit, dass dieser an die DNA bindet und die Transkription einleitet, ansteigt. Daher sollte getestet werden, ob TCF11, Nrf2 und c-Jun nach Proteasominhibition im Zellkern akkumulieren, da sie nur so die Transkription der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition aktivieren können. Um dies zu untersuchen, wurden Ea.hy926 Zellen mit DMSO oder Epoxomicin für 24 h behandelt und anschließend die nicht-nukleären (cytosolische und membrangebundene) von den nukleären Proteinen getrennt. Nach DMSO Behandlung wurden im Immunoblot mit dem TCF11 Antikörper in der nicht-nukleären Fraktion zwei Proteine bei ca. 150 kDa nachgewiesen (Abb. 3.10A). Im humanen System existiert neben TCF11 (772 Aminosäuren) die um 30 Aminosäuren kleinere Isoform Nrf1 (742 Aminosäuren). Da die humane Zelllinie Ea.hy926 beide Isoformen auf mRNA Ebene in etwa zum gleichen Maße exprimiert (Abb. 3.10B) und der verwendete Antikörper gegen ein Epitop generiert wurde, das in beiden Proteinen vorkommt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den beiden Proteinen in der nicht-nukleären Fraktion sehr wahrscheinlich um TCF11 und Nrf1 handelt (Abb. 3.10A). In der nukleären Fraktion fehlten diese vollkommen. Wurden die Proteasomen mit Epoxomicin inhibiert, kam es in der nicht-nukleären Fraktion zu einer sehr starken Akkumulation von TCF11 bzw. Nrf1. Zusätzlich akkumulierten noch hoch- und niedermolekulare TCF11 bzw. Nrf1 Spezies, die nach DMSO Behandlung nicht zu beobachten waren. In der nukleären Fraktion konnten nun im Vergleich zur DMSO Behandlung zwei Proteine detektiert werden, die im Unterschied zu denen aus der nicht-nukleären Fraktion nur bei ca. 130 kDa im SDS-Gel migrierten. Folglich führte die Proteasominhibition zu einer Anhäufung von TCF11 und Nrf1 im Zellkern.

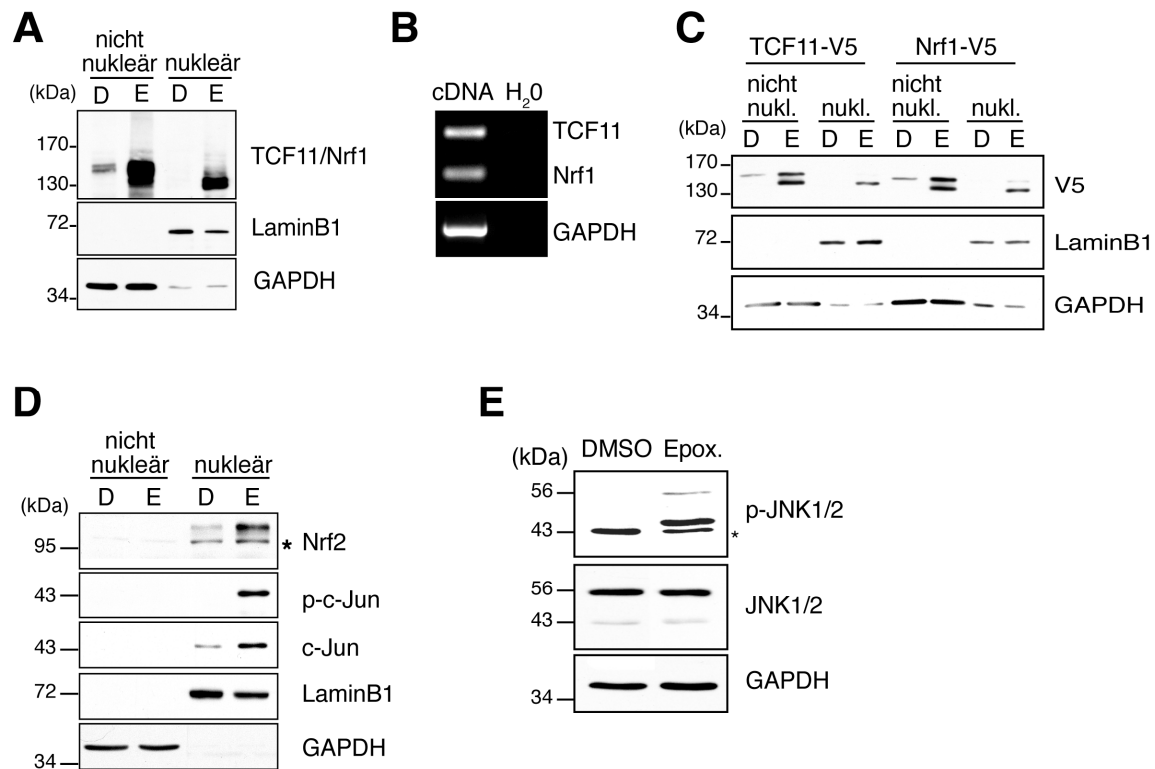


Abb. 3.10: TCF11/Nrf1, Nrf2 und c-Jun akkumulieren nach Epoxomicin Behandlung im Zellkern
 A) Ea.hy926 Zellen wurden für 24 h mit Epoxomicin (E) oder 0,1 % DMSO (D) behandelt. Anschließend wurden die nicht-nukleären und die nukleären Proteine isoliert und mit einem Immunoblot die Verteilung von TCF11/Nrf1 in den Fraktionen untersucht. Die Trennung zwischen den nicht-nukleären und den nukleären Proteinen wurde durch Antikörper gegen das cytosolische Protein GAPDH und das nukleäre Protein LaminB1 überprüft. B) RT-PCR mit cDNA von unbehandelten Ea.hy926 Zellen und spezifischen Primern gegen TCF11/Nrf1 und GAPDH C) In Ea.hy926 Zellen wurde entweder V5-markiertes TCF11 oder V5-markiertes Nrf1 überexprimiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit 10 nM Epoxomicin (E) oder 0,1 % DMSO (D) für 24 h behandelt. Anschließend folgte eine biochemische Fraktionierung der nicht-nukleären (nicht nukl.) und der nukleären (nukl.) Proteine. Die Verteilung von TCF11 bzw. Nrf1 wurde mittels Immunoblot und einem gegen das V5-Epitop gerichteten Antikörper untersucht. Das cytosolische Protein GAPDH und das nukleäre LaminB1 dienen als Marker für die Trennung. D) Präparation von nicht-nukleären bzw. nukleären Proteinextrakten aus Ea.hy926 Zellen, die mit 0,1 % DMSO (D) oder 10 nM Epoxomicin (E) für 24 h behandelt wurden. Die hergestellten Extrakte wurden durch Immunoblot auf Nrf2, c-Jun und phosphoryliertes c-Jun (p-c-Jun) untersucht. Die Trennung zwischen den nicht-nukleären und den nukleären Proteinen wurde mit Antikörpern gegen das cytosolische Protein GAPDH und das nukleäre Protein LaminB1 überprüft. E) Wie unter D) beschrieben, jedoch wurden Totalzellextrakte hergestellt. Diese wurden mit einem Immunoblot auf phosphorylierte (p-JNK1/2) bzw. nicht-phosphorylierte JNK1/2 und GAPDH (Ladekontrolle) untersucht. * unspezifische Bande

Allerdings konnte in den Fraktionierungsanalysen nicht eindeutig differenziert werden, ob TCF11 und/oder Nrf1 vermehrt im Zellkern akkumulierten, da der benutzte Antikörper beide Proteine erkennt. Um dieses Problem zu umgehen, wurde entweder C-terminal V5-markiertes TCF11 oder Nrf1 in Ea.hy926 Zellen überexprimiert und die Zellen zusätzlich mit Epoxomicin behandelt. Anschließend wurden erneut die nicht-nukleären von den nukleären Proteinen getrennt und die Verteilung von TCF11 bzw. Nrf1 über die Detektion des V5-Epitops bestimmt.

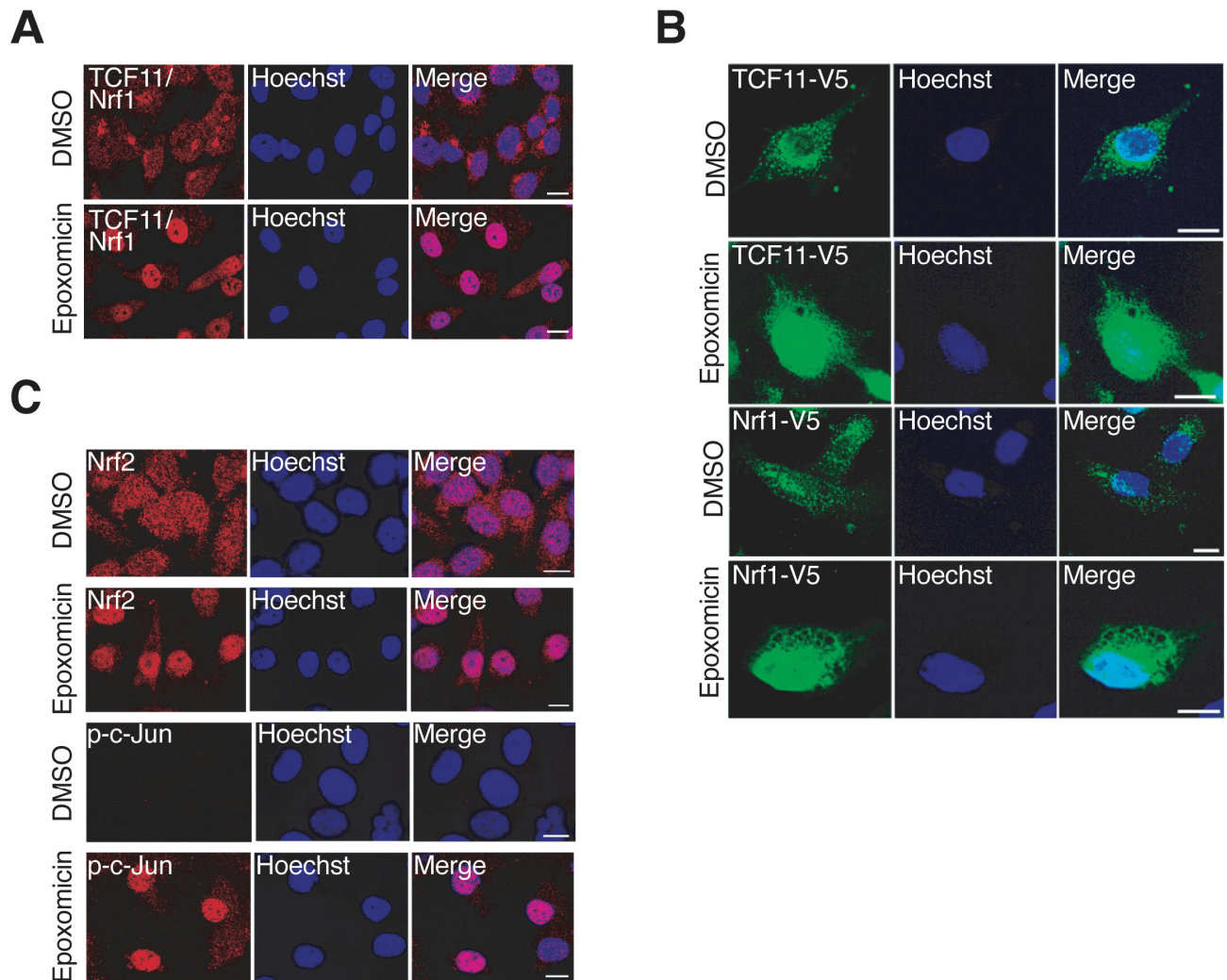


Abb. 3.11: Endogene TCF11/Nrf1, Nrf2 und p-c-Jun akkumulieren nach Epoxomicin Behandlung im Zellkern A) Ea.hy926 Zellen wurden entweder mit 0,1 % DMSO oder 10 nM Epoxomicin für 24 h behandelt und anschließend mit Methanol fixiert. Mit konfokalen Immunfluoreszenzaufnahmen wurde die intrazelluläre Lokalisation von endogenem TCF11/Nrf1 bestimmt. B) In Ea.hy926 Zellen wurde entweder V5-markiertes TCF11 oder V5-markiertes Nrf1 überexprimiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit 10 nM Epoxomicin oder 0,1 % DMSO für 24 h behandelt und im Anschluss mit Methanol fixiert. Mit einem Antikörper gegen das V5-Epitop wurden in konfokalen Immunfluoreszenzaufnahmen die Lokalisationen von TCF11-V5 oder Nrf1-V5 bestimmt. C) Konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von Methanol fixierten Ea.hy926 Zellen, die für 24 h mit 0,1 % DMSO oder 10 nM Epoxomicin behandelt wurden. Mit Antikörpern gegen Nrf2 und phosphoryliertes c-Jun (p-c-Jun) wurden deren zelluläre Lokalisationen bestimmt. Die Zellkerne wurden in allen Aufnahmen mit Hoechst33258 angefärbt. Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 10 µm.

Es zeigte sich, dass V5-markiertes TCF11 nach DMSO Behandlung nur in der nicht-nukleären Fraktion vorhanden war (Abb. 3.10C). Nrf1-V5 war ebenfalls nur in der nicht-nukleären Fraktion lokalisiert und migrierte im SDS Gel verglichen zu TCF11-V5 bei einem geringeren Molekulargewicht. Nach der Behandlung von Zellen mit Epoxomicin nahm die Menge an TCF11-V5 bzw. Nrf1-V5 in der nicht-nukleären Fraktion deutlich zu. Zusätzlich wurde bei beiden Isoformen eine niedermolekulare Spezies nachgewiesen (Abb. 3.10C).

Diese hatte das gleiche Molekulargewicht, wie eine in der nukleären Fraktion nachweisbare Form. Folglich gab es zwischen TCF11 und Nrf1 sowohl nach DMSO als auch Epoxomicin keinen Unterschied in der zellulären Verteilung. Die Menge an nukleärem Nrf2 nahm nach der Epoxomicin Behandlung gegenüber der DMSO Behandlung ebenfalls deutlich zu (Abb. 3.10D). Ebenso war die Menge an nukleärem c-Jun durch die Proteasominhibition mit Epoxomicin stark erhöht (Abb. 3.10D). Zusätzlich war das nukleäre c-Jun verstärkt am Serin 63 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt zur Aktivierung von c-Jun und erfolgt durch die Kinasen JNK1/2, die ebenfalls durch die Proteasominhibition phosphoryliert werden, was auch deren Aktivierung bewirkt (Abb. 3.10E, (Pulverer et al. 1991; Smeal et al. 1991; Davis 2000)). Die Menge an nicht-phosphorylierten JNK1/2 war unverändert. Zur Bestätigung der Ergebnisse, die aus den biochemischen Fraktionierungsversuchen gewonnen wurden, wurden Immunfluoreszenzaufnahmen von Ea.hy926 Zellen angefertigt, die entweder mit DMSO oder Epoxomicin behandelt worden waren. Auch in diesen zeigte sich, dass die Proteasominhibition durch Epoxomicin zu einer nukleären Anreicherung von TCF11/Nrf1 bzw. Nrf2 führte (Abb. 3.11A,B,C). Phosphoryliertes c-Jun ließ sich wie in der Fraktionierung nur nach Epoxomicin Behandlung nachweisen und war dann ebenfalls nur im Zellkern lokalisiert (Abb. 3.11C).

3.1.11 TCF11/Nrf1 binden nach Proteasominhibition verstärkt an AREs von proteasomalen Promotoren

Nach Proteasominhibition kommt es zur verstärkten Bindung von nukleären Proteinen an das ARE-17 des PSMB6-Promotors (Abb. 3.5A). Durch Mutationsstudien im Reporterassay wurde deutlich, dass für eine Aktivierung des PSMB6-Promotors das ARE-17 absolut essentiell war (Abb. 3.4, 3.7B) und dass *in vitro* synthetisiertes TCF11 bzw. Nrf2 als Heterodimer mit MafG an das ARE-17 bindet (Abb. 3.8A). Dagegen war c-Jun nicht in der Lage an das ARE-17 zu binden. Da jedoch nach Proteasominhibition TCF11/Nrf1, Nrf2 und das durch die Phosphorylierung aktivierte c-Jun im Zellkern akkumulierten, sollte untersucht werden, ob TCF11/Nrf1, Nrf2 oder phosphoryliertes c-Jun an AREs in den proteasomalen Promotoren nach Proteasominhibition binden. Dazu wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation durchgeführt, in dem Ea.hy926 Zellen mit DMSO oder Epoxomicin für 24 h behandelt wurden. Anschließend wurde das Chromatin mit den an ihm gebundenen Proteinen fixiert. Es folgte eine Immunpräzipitation gegen TCF11/Nrf1, Nrf2 und am Serin 63 phosphoryliertem c-Jun. Durch die Immunpräzipitation von TCF11/Nrf1 kam es im Vergleich zu einem unspezifischen Immunglobulin G (IgG) zur Anreicherung von Chromatin, das AREs aus den Promotoren von den proteasomalen Genen PSMB6, PSMA3, PSMC4 und dem

Phase-2-Enzym NQO1 enthielt (Abb. 3.12). Das ARE aus dem NQO1 Promotor diene als Positivkontrolle. Ein Abschnitt des Tubulin Promotors wurde nicht präzipitiert, was die Spezifität der Anreicherung verdeutlichte. Wenn die Zellen mit Epoxomicin behandelt wurden, kam es zu einer verstärkten Anreicherung ARE enthaltender Chromatinabschnitte. Daraus kann man schlussfolgern, dass TCF11 und/oder Nrf1 vermehrt an die untersuchten AREs gebunden haben. Mit einem Antikörper gegen Nrf2 konnten ebenfalls die ARE enthaltenen Chromatinabschnitte präzipitiert werden. Jedoch war die Anreicherung geringer als bei der Immunpräzipitation gegen TCF11/Nrf1. Eine Ausnahme bildet hier das ARE aus dem NQO1-Promotor, welches genauso gut präzipitiert wurde. Dies war allerdings zu erwarten, da Nrf2 wie TCF11/Nrf1 als einer der Transkriptionsfaktoren beschrieben ist, der an dieses ARE bindet (Sun et al. 2007). Des Weiteren stellte sich heraus, dass Nrf2 nach Proteasominhibition nicht vermehrt an das ARE-45 des PSMA3-Promotors und an das ARE-204 aus dem PSMC4-Promotor gebunden hatte. Lediglich am ARE-17 des PSMB6-Promotors war eine geringe Zunahme der Bindung zu beobachten, die im Vergleich zu TCF11/Nrf1 allerdings deutlich geringer war. Eine Bindung von phosphoryliertem c-Jun an die untersuchten AREs war nicht zu beobachten (Abb. 3.12).

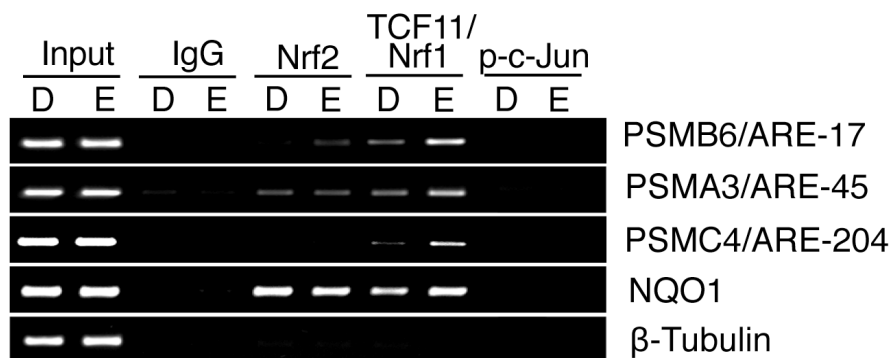


Abb. 3.12: TCF11 und/oder Nrf1 binden nach Proteasominhibition vermehrt an AREs aus proteasomalen Promotoren Für die Chromatin-Immunpräzipitation wurden Ea.hy926 Zellen mit 10 nM Epoxomicin oder 0,1 % DMSO für 24 h behandelt. Danach wurden die Proteine mit der DNA fixiert, die DNA geschert und Nrf2, TCF11/Nrf1 und phosphoryliertes c-Jun (p-c-Jun) mit spezifischen Antikörpern präzipitiert. Die DNA wurde von den Transkriptionsfaktoren getrennt und in der PCR verwendet. Die PCR erfolgte mit spezifischen Primern für die AREs aus den Promotoren der proteasomalen Gene PSMB6, PSMA3, PSMC4 und dem Promotor der NQO1 (Positivkontrolle). Als Negativkontrolle dienten Primer gegen eine Sequenz ohne AREs aus dem β-Tubulin Promotor.

3.1.12 TCF11/Nrf1 regulieren die Transkription der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition

Da TCF11 und/oder Nrf1 nach Proteasominhibition verstärkt an AREs aus den humanen proteasomalen Promotoren gebunden hatten, und TCF11 die Transkription der proteasomalen Gene stärker aktivieren kann als Nrf2 oder c-Jun, war es sehr

wahrscheinlich, dass TCF11 und/oder Nrf1 die Transkription der proteasomalen Gene aktivieren. Um deren Einflüsse zu konkretisieren, wurden die endogenen Expressionen von TCF11/Nrf1, Nrf2 oder c-Jun durch spezifische siRNAs herabgesetzt und die Transkription des Reportergens in Reporterassays oder die Transkription von endogenen proteasomalen Untereinheiten untersucht. Entsprechend den Erwartungen resultierte sowohl die Reduktion der Nrf2 Expression als auch die von c-Jun in keiner veränderten Expression des Reportergens oder der endogenen Untereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 1$ verglichen mit der Kontroll siRNA (Kon siRNA) (Abb. 3.13A,B).

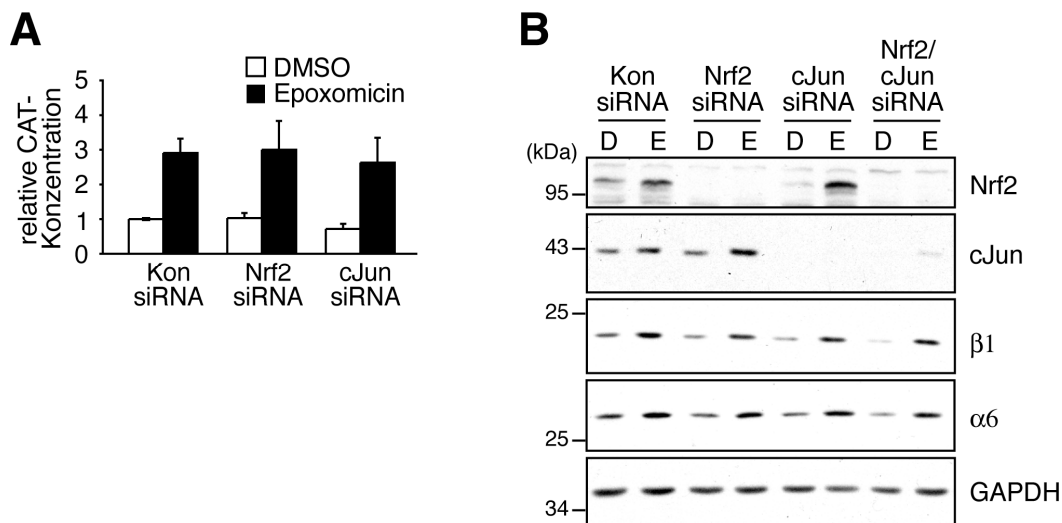


Abb. 3.13: Die durch siRNAs verringerten Expressionen von Nrf2 und c-Jun hatten keinen Einfluss auf die gesteigerte Genexpression der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition
A) Reporterassay mit dem Wildtyp pCAT1500 nach verminderter Expression von Nrf2 oder c-Jun und Proteasominhibition. Ea.hy926 Zellen wurden entweder mit einer siRNA gegen Nrf2 oder c-Jun (je 50 nM) transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Transfektion von 0,6 μ g pCAT1500 und 0,1 μ g pcDNA3.1-lacZ für 8 h. Anschließend wurden die Zellen entweder mit 10 nM Epoxomicin oder 0,1 % DMSO für 16 h behandelt. Die Expression des CAT-Reportergens wurde mit einem ELISA bestimmt und auf die β -Galactosidaseaktivität normiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Experimenten mit Doppelwerten. B) Ea.hy926 Zellen wurden entweder mit einer nicht funktionellen Kontroll siRNA (Kon siRNA) oder spezifischen siRNAs gegen Nrf2 oder c-Jun für 48 h transfiziert und danach für 24 h mit 10 nM Epoxomicin oder 0,1 % DMSO behandelt. Von den Zellen wurden Komplettlysate hergestellt und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion auf die Proteasomuntereinheiten $\beta 1$ und $\alpha 6$ sowie auf die Proteine Nrf2, c-Jun und GAPDH erfolgte durch Immunoblot.

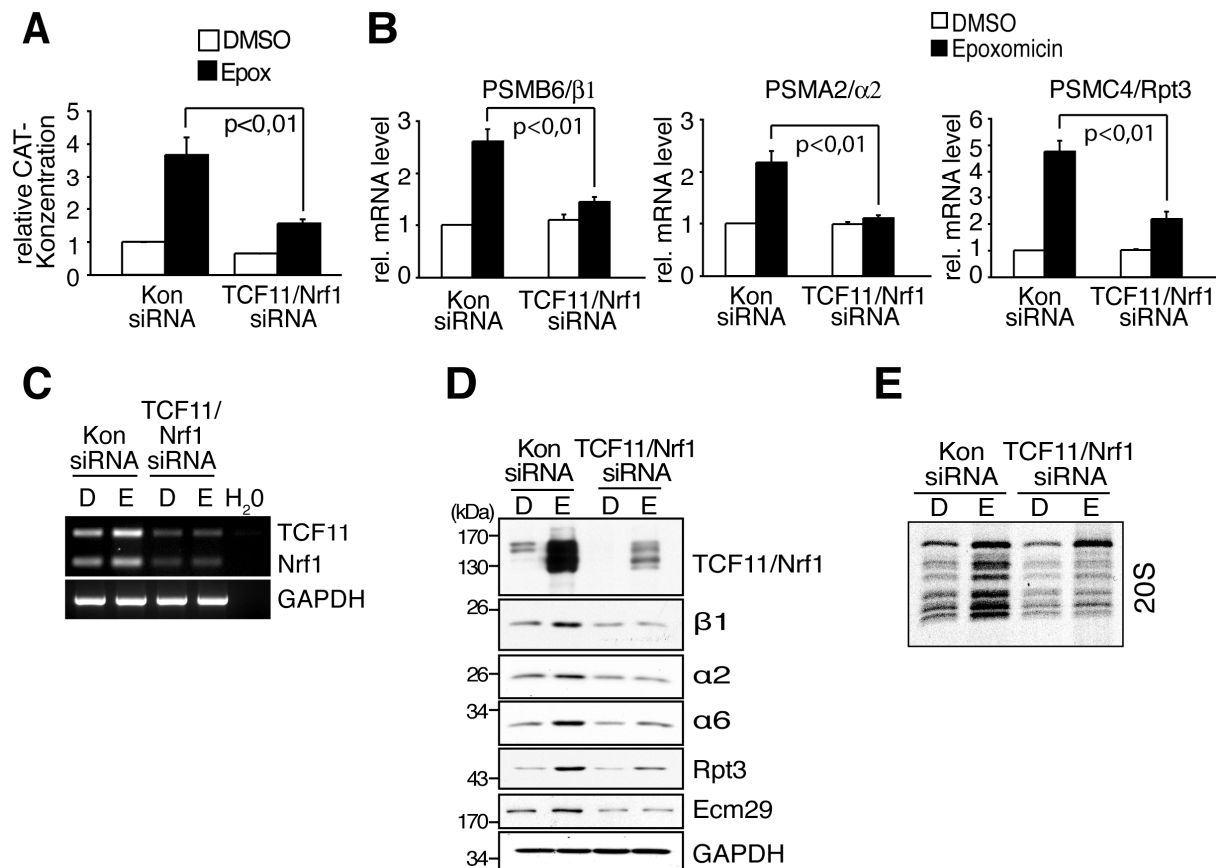


Abb. 3.14: Die verringerten Expressionen von TCF11/Nrf1 führen zu einer verminderten Expression der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition Ea.hy926 Zellen wurden entweder mit spezifischen siRNAs gegen TCF11/Nrf1 oder einer funktionslosen siRNA (Kon siRNA) für 48 h transfiziert. A) 48 h nach der siRNA Transfektion wurden die Zellen mit dem Wildtyp pCAT1500 Reporterkonstrukt (0,6 µg) und pcDNA3.1-lacZ (0,1 µg) kotransfiziert. Nach weiteren 8 h wurden die Zellen mit 10 nM Epoxomicin (Epox) bzw. 0,1 % DMSO für 16 h behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert, die CAT-Konzentration mit einem ELISA bestimmt und diese auf die β-Galactosidaseaktivität normiert. Vorliegende Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit Doppelwerten. B) Im Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen entweder mit 10 nM Epoxomicin oder 0,1 % DMSO für 24 h behandelt. Aus den Zellen wurde RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Anschließend folgte eine real-time PCR mit Primern gegen die proteasomalen Gene PSMB6, PSMA2 und PSMC4. Die Expressionen von PSMB6, PSMA2 und PSMC4 wurden auf die Expression des HPRT1 Gens normiert (n=3). C) Die cDNA aus B wurde in einer RT-PCR mit Primern gegen TCF11/Nrf1 und GAPDH eingesetzt. GAPDH diente als Standard. D) Die Zellen wurden wie unter B beschrieben transfiziert und behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit einem Western-Blot und spezifischen Antikörpern auf TCF11/Nrf1, β1, α2, α6, Rpt3, Ecm29 und GAPDH untersucht. GAPDH diente als Ladekontrolle. E) Nachdem die Zellen mit den siRNAs transfiziert wurden, wurden sie entweder mit 0,1 % DMSO (D) oder 10 nM Epoxomicin (E) für 24 h behandelt. Die Zellen wurden metabolisch radioaktiv markiert, lysiert und die 20S Proteasomen mit einem Antikörper gegen die α6 Untereinheit immunpräzipitiert. Die präzipitierten 20S Proteasomen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, das Gel getrocknet und die neu assemblierten 20S Proteasomen mittels Autoradiographie sichtbar gemacht.

Waren die Expressionen von TCF11 und Nrf1 durch die siRNA reduziert, so hatte dies nur einen geringen Effekt auf die basale Expression des Reportergens. Nach verringerter Expression von TCF11/Nrf1 wurde die verstärkte Expression des Reportergens nach

Proteasominhibition um ca. 60 % reduziert. Anstatt einer 4 fachen Zunahme kam es nur noch zu einer 1,6 fachen Steigerung der Expression (Abb. 3.14A). Zur weiteren Bestätigung wurden die endogenen Expressionslevel der drei proteasomalen Untereinheiten PSMA2, PSMB6 und PSMC4 mittels real-time PCR bestimmt. Analog zum Reporterassay kam es nach der Proteasominhibition ebenso zu einer erhöhten Transkription der Gene (Abb. 3.14B). Die Verminderung der TCF11/Nrf1 Expression mittels siRNA führte dazu, dass die Gene PSMA2, PSMB6 und PSMC4 nach Proteasominhibition geringer transkribiert wurden als nach Transfektion mit der Kontroll siRNA (Kon siRNA) (Abb. 3.14B). Allerdings wurde die Transkription nicht soweit inhibiert, dass das mRNA Level identisch mit dem nach DMSO Behandlung war. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die nur zu ca. 70 % minimierte TCF11/Nrf1 Expression sein (Abb. 3.14C). Weiter war zu beobachten, dass TCF11 und Nrf1 nach Proteasominhibition verstärkt transkribiert wurden, wobei die Transkription von TCF11 etwas stärker zu sein schien (Abb. 3.14C). Um zu überprüfen, ob sich die verminderte Transkription der proteasomalen Gene auch auf der Proteinebene widerspiegelt, wurden die Proteinmengen von den vier proteasomalen Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 6$, $\beta 1$ und Rpt3 im Immunoblot bestimmt. Die Behandlung von Zellen mit Epoxomicin erhöhte die Proteinmenge der vier Untereinheiten und die des Proteasom assoziierten Proteins Ecm29 (Abb. 3.14D). Die größte Zunahme der Proteinmenge war analog zur real-time PCR bei der ATPase Rpt3/PSMC4 zu beobachten. Wenn die zelluläre Menge an TCF11/Nrf1 mittels RNAi verringert war, war die Epoxomicin vermittelte Steigerung der Proteinmengen vermindert. Die geringeren Proteinmengen führten parallel zu einer verminderten Assemblierung neuer 20S Proteasomen (Abb. 3.14E). Während nach Proteasominhibition unter Kontrollbedingungen (Kon siRNA) circa doppelt so viel neu formiertes 20S Proteasom vorhanden war, führte die gegen TCF11/Nrf1 gerichtete siRNA dazu, dass es keine neuen 20S Proteasomen gab. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass TCF11/Nrf1 für die Transkription der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition verantwortlich sind.

3.1.13 TCF11 ist im Vergleich zu Nrf1 der entscheidende Transkriptionsfaktor für die Transkription der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition

Durch die Überexpressionsversuche wurde deutlich, dass TCF11 die Transkription der proteasomalen Gene aktiviert (Abb. 3.7A, 3.9A-D, Tab. 3.2). Jedoch akkumulierten sowohl TCF11 als auch Nrf1 nach Proteasominhibition vermehrt im Zellkern und durch die verwendete siRNA wurde sowohl die Expression von TCF11 als auch Nrf1 verringert. Somit

könnte auch Nrf1 die Transkription der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition regulieren.

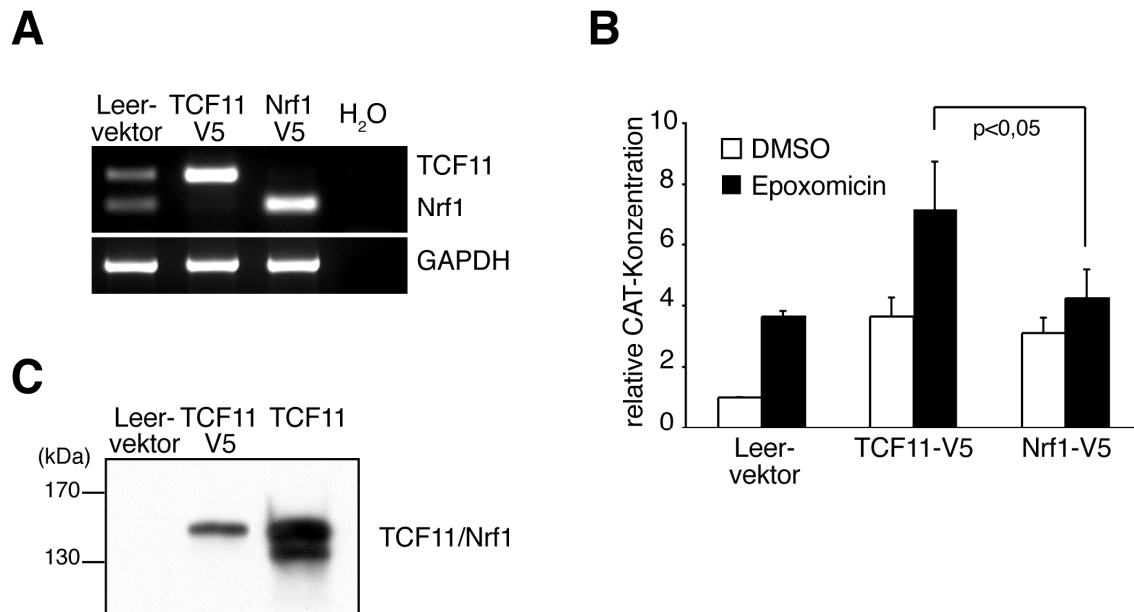


Abb. 3.15: TCF11 ist maßgebend für die Transkription der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition A) Ea.hy926 Zellen wurden für 24 h mit dem Leervektor, TCF11-V5 bzw. Nrf1-V5 transfiziert. Anschließend wurde aus den Zellen die RNA isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde in einer RT-PCR mit Primern gegen TCF11/Nrf1 und GAPDH eingesetzt. GAPDH diente als Standard. B) V5-markiertes TCF11 (0,05 µg) oder V5-markiertes Nrf1 (0,05 µg) wurden in Ea.hy926 Zellen überexprimiert. Zusätzlich wurden die Zellen noch mit dem Wildtyp pCAT1500 Promotorkonstrukt (0,6 µg) und dem Plasmid pcDNA3.1-lacZ (0,1 µg) kotransfiziert. Nach 8 h Transfektion wurden die Zellen mit 10 nM Epoxomicin oder 0,1 % DMSO für 16 h behandelt. Die Zellen wurden nach der Epoxomicin Behandlung lysiert und die CAT-Konzentration mit einem ELISA gemessen. Diese wurde auf die β -Galactosidaseaktivität normiert. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit Doppelwerten. C) In Ea.hy926 Zellen wurde entweder TCF11-V5 oder TCF11 für 24 h überexprimiert. Als Kontrolle diente ein Leervektor. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Proteine mit einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion der überexprimierten TCF11 Formen erfolgte mittels Immunoblot.

Daher wurde zunächst geprüft, ob Nrf1 überhaupt in der Lage ist, den PSMB6-Promotor zu aktivieren. Aufgrund der Tatsache, dass durch die Überexpression von TCF11 bzw. Nrf1 die Expressionen der jeweiligen endogenen Isoformen vollkommen unterdrückt werden (Abb. 3.15A), kann man mit der Überexpression der einzelnen Isoformen deren Funktionen genauer analysieren. Zu diesem Zweck wurden Reporterassays durchgeführt, in denen entweder V5-markiertes TCF11 oder Nrf1 mit dem Reporterkonstrukt pCAT1500 kotransfiziert wurden. Dabei wurde deutlich, dass TCF11 und Nrf1 den PSMB6-Promotor etwa um den gleichen Faktor aktivieren konnten (Abb. 3.15B). Auffällig war jedoch, dass durch die Überexpression von TCF11-V5 die Expression des Reportergens nur um das 4 fache gesteigert wurde und somit im Vergleich zu vorherigen Reporterassays geringer

ausfiel. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass TCF11 durch das verwendete Plasmid geringer überexprimiert wurde, als durch das zuvor benutzte (Abb. 3.15C) oder das V5-Epitop die Aktivität beeinflusst. Wenn die Zellen im Reporterassay anstatt mit DMSO mit Epoxomicin behandelt wurden, führte dies im Fall von TCF11 zu einer 2-fach gesteigerten Expression des Reportergens, dagegen im Fall von Nrf1 nur zu einem 1,4-fachen Anstieg der Expression (Abb. 3.15B). Folglich hatten sowohl TCF11 als auch Nrf1 einen Einfluss auf die Transkription der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition. Der Einfluss von TCF11 war jedoch deutlich ausgeprägter. Aus diesen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass TCF11 der entscheidende Transkriptionsfaktor ist, der die Transkription der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition aktiviert.

3.1.14 TCF11 reguliert neben den proteasomalen vermutlich auch andere im UPS involvierte Gene

Auf eine Reduktion der proteasomalen Aktivität durch Proteasominhibitoren reagiert die Zelle mit einer gesteigerten Transkription der proteasomalen Gene (Meiners et al. 2003). Das 26S Proteasom ist jedoch nur eine Komponente im Ubiquitin-Proteasom-System. Die anderen Komponenten sind die Ubiquitin-aktivierenden (E1), -konjugierenden (E2), -ligierenden (E3) und deubiquitinierenden (DUB) Enzyme (Pickart and Eddins 2004). Die Kombination von diesen Enzymen ist für den Abbau von Proteinen ebenso wichtig, wie die proteolytische Aktivität des Proteasoms. Daher war von großem Interesse, ob die Proteasominhibition auch zu einer erhöhten Transkription dieser Enzyme führt. Infolgedessen wurden Zellen mit 10 oder 20 nM Epoxomicin für 24 h behandelt, aus diesen die RNA isoliert und durch microarray Analysen die Transkription von E1-, E2- und E3-Enzymen und DUBs bestimmt. Als Antwort auf die Proteasominhibition wurden 1 E1-, 19 E2-, 162 E3-Enzyme und 32 DUBs vermehrt transkribiert (Tab. 1 im Anhang). Folglich hatte die Proteasominhibition Auswirkung auf einen Großteil des Ubiquitin-Proteasom-Systems.

Nach der Überexpression von TCF11 wurden die meisten der 32 Standard proteasomalen Gene verstärkt transkribiert (Tab. 3.2). Um dessen Einfluss auch auf die Transkription von Genen, die im UPS involviert sind zu untersuchen, wurden die Expressionslevel aller UPS Gene mittels microarray Analyse bestimmt. In der Analyse zeigte sich, dass 11 E2-, 59 E3-Enzyme und 9 DUBs durch die Überexpression von TCF11 gesteigert exprimiert wurden (Tab. 1 im Anhang). Dabei war auffällig, dass die Transkription dieser UPS Gene ebenfalls nach Epoxomicin erhöht war. Daraus kann man schlussfolgern, dass TCF11 die Transkription dieser Gene nach Proteasominhibition sehr wahrscheinlich reguliert.

3.2 Lokalisation und Abbau von TCF11 und Nrf1

3.2.1 TCF11 und Nrf1 sind ER-ständige Membranproteine

Ursprünglich wurde TCF11 auf Grund von mikroskopischen Aufnahmen sowohl als cytosolisches als auch nukleäres Protein beschrieben. Hingegen sollte Nrf1 vorwiegend nukleär lokalisiert sein, da diesem ein „nuclear export signal“ fehlte (Husberg et al. 2003). Neuere Arbeiten beschreiben Nrf1 jedoch als ein ER-ständiges Membranprotein (Wang and Chan 2006; Zhang et al. 2006). In Fraktionierungen der vorliegenden Arbeit waren TCF11 und Nrf1 hauptsächlich in den nicht-nukleären Fraktionen lokalisiert, die sowohl lösliche cytosolische als auch membrangebundene Proteine enthielten (Abb. 3.10A,C). Um zu unterscheiden, ob TCF11 und Nrf1 membrangebundene oder lösliche cytosolische Proteine sind, wurden erneut biochemische Fraktionierungen durchgeführt. Diesmal erfolgte zusätzlich eine Trennung zwischen löslichen und membrangebundenen Proteinen. Der gegen TCF11 und Nrf1 gerichtete Antikörper erkannte erneut TCF11 und Nrf1 bei ungefähr 150 kDa, allerdings hauptsächlich nur in der Membranfraktion (Abb. 3.16A). In der nukleären Fraktion war eine schwache niedermolekulare Form nachweisbar. Neben dieser Form wurde in der cytosolischen Fraktion noch zusätzlich eine höher molekulare Form nachgewiesen. Allerdings wurde offensichtlich, dass die Hauptmenge von TCF11/Nrf1 in der Membranfraktion zu finden war. Eine Aussage zur exakten zellulären Lokalisation konnte nicht getroffen werden, da in der Membranfraktion alle Membranen angereichert wurden. Da Nrf1 ein ER-ständiges Membranprotein sein soll, wurde in konfokalen Immunfluoreszenzaufnahmen die Lokalisation von TCF11/Nrf1 mit der des ER-ständigen Membranproteins Calnexin verglichen. In den Aufnahmen kam es zu einer partiellen Kolo-kalisation von TCF11/Nrf1 mit Calnexin (Abb. 3.16B). Wie schon in vorherigen Experimenten konnte anhand des TCF11/Nrf1 Antikörpers nicht zwischen TCF11 und Nrf1 unterschieden werden. Aus diesem Grund wurden sowohl die Fraktionierungen als auch die mikroskopischen Untersuchungen nach Überexpression von TCF11-V5, Nrf1-V5 oder Nrf1-myc wiederholt. In den biochemischen Fraktionierungen ließen sich erneut beide Proteine zum größten Teil nur in der Membranfraktion nachweisen (Abb. 3.16C). Daraus kann man eindeutig schlussfolgern, dass TCF11 und Nrf1 primär membranständige Proteine sind. Anhand der konfokalen Immunfluoreszenzaufnahmen konnte eine ER-ständige Lokalisation von TCF11 und Nrf1 bestätigt werden, da beide Proteine mit der ER-ständigen Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) partiell kolo-kalisiert (Abb. 3.16D). Mit den Ergebnissen der biochemischen Fraktionierungen und den Immunfluoreszenzaufnahmen wurden TCF11 und Nrf1 als ER-ständige Membranproteine bestätigt.

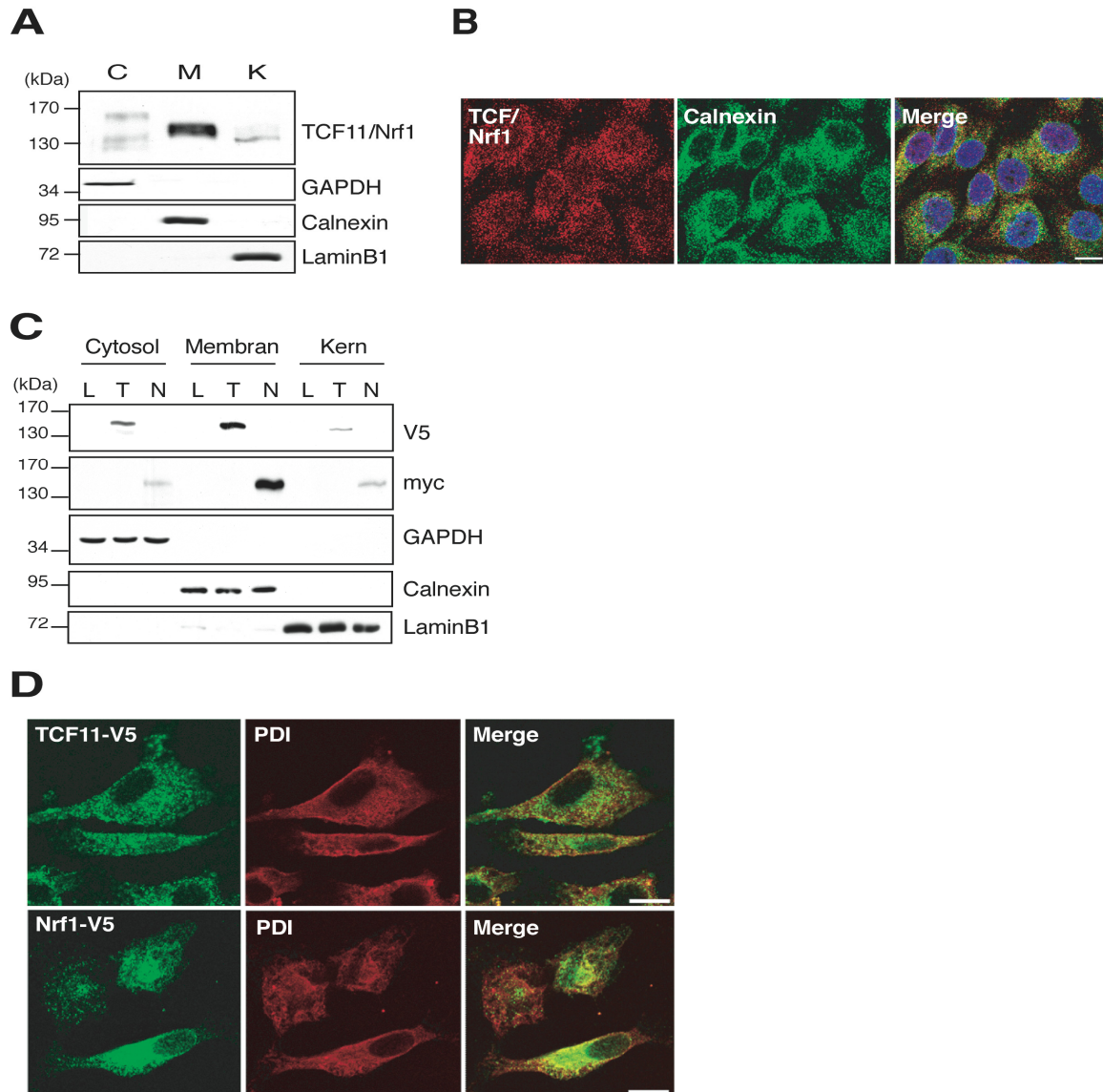


Abb. 3.16: TCF11 und Nrf1 sind ER-ständige Membranproteine A) Biochemische Fraktionierung von cytosolischen (C), membrangebundenen (M) und nukleären (K) Proteinen aus Ea.hy926 Zellen. Die Verteilung von TCF11/Nrf1 zwischen den einzelnen Fraktionen wurde mit einem Immunoblot und einem gegen TCF11/Nrf1 gerichteten Antikörper untersucht. Das cytosolische Protein GAPDH, das ER-ständige Membranprotein Calnexin und das nukleäre Protein LaminB1 dienen als Markerproteine für die einzelnen Fraktionen. B) Konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von PFA fixierten Zellen mit einem Antikörper gegen TCF11/Nrf1 (pAk) zur Bestimmung der zellulären Lokalisation dieser Proteine. Ein Calnexin (mAk) Antikörper diente zur Visualisierung des ERs. Die Kernfärbung erfolgte mit Hoechst33258. Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 10 μ m. C) Ea.hy926 Zellen wurden für 24 h mit Plasmiden transfiziert, die entweder zur Expression von V5-markiertem TCF11 (T) oder myc-markiertem Nrf1 (N) führten. Als Kontrolle wurden Zellen mit dem Leervektor (L) transfiziert. Aus diesen Zellen wurden die cytosolischen, membrangebundenen und nukleären Proteine isoliert und mittels Immunoblot die Verteilung von TCF11 und Nrf1 in den unterschiedlichen Fraktionen analysiert. Die Trennung zwischen den einzelnen Fraktionen wurde mit Antikörpern gegen das cytosolische Protein GAPDH, das ER-ständige Membranprotein Calnexin und das nukleäre Protein LaminB1 überprüft. D) Zur Analyse der Lokalisation von TCF11-V5 und Nrf1-V5 innerhalb der Zelle wurden TCF11-V5 oder Nrf1-V5 für 24 h in Ea.hy926 Zellen überexprimiert und anschließend von diesen Zellen konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen angefertigt. Die Detektion von TCF11 und Nrf1 erfolgte mit einem gegen das V5-Epitop (mAk) gerichteten Antikörper und die des ERs mit einem Antikörper gegen das luminal ER-ständige Protein PDI (pAk). Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 10 μ m.

3.2.2 Nukleäres TCF11 bzw. Nrf1 ist nicht N-glykosyliert

Die Mehrzahl der Proteine, die am rauen ER-translatiert werden, wird N-glykosyliert. Die Glykosylierung dient dabei oft zur korrekten Faltung, dem Schutz vor Abbau und dem zielgerichteten Transport des Proteins zu seinem Bestimmungsort. Das murine Nrf1 ist als ER-ständiges Membranprotein N-glykosyliert (Zhang et al. 2007). Jedoch ist über die Funktion der Glykosylierung nichts bekannt. Des Weiteren ist nicht eindeutig bekannt, ob das nukleäre Nrf1 immer noch N-glykosyliert ist. Um herauszufinden, ob die N-Glykosylierung während der Translokation vom ER in den Zellkern abgespalten wird, wurden die zellulären Proteine, von DMSO oder Epoxomicin behandelten Zellen, erneut in nicht-nukleäre und nukleäre Proteine fraktioniert. Die Zellen wurden mit Epoxomicin behandelt, weil nur dann nukleäres TCF11/Nrf1 nachzuweisen war. Im Anschluss an die Fraktionierung wurden die über Asparagin verknüpften Oligosaccharide durch einen PNGase F (peptide: N-glycosidase F) Verdau abgespalten. In der nicht-nukleären Fraktion waren sowohl nach DMSO als auch nach Epoxomicin zwei Proteine bei 150 kDa nachweisbar (Abb. 3.17). Dabei handelt es sich um membrangebundenes TCF11/Nrf1 (Abb. 3.16A). Durch den PNGase F Verdau wurde das Molekulargewicht der Proteine reduziert. Dies deutet darauf hin, dass membrangebundene TCF11/Nrf1 N-glykosyliert sind. In der nukleären Fraktion waren TCF11/Nrf1 nur nach Epoxomicin Behandlung nachweisbar. Die Hauptmenge migrierte im SDS-Gel bei ca. 130 kDa. Darüber hinaus gab es noch höher molekulare Formen, bei denen es sich wahrscheinlich um nicht-nukleäre Verunreinigungen oder anderweitig modifizierte Formen handeln kann.

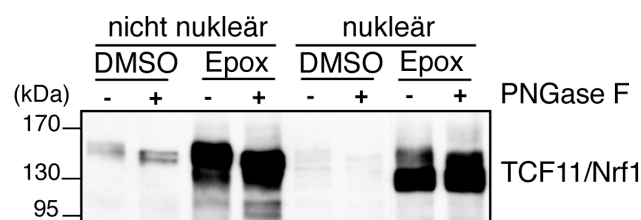


Abb. 3.17: Nicht-nukleäres TCF11/Nrf1 ist N-glykosyliert, wogegen nukleäre Formen dies nicht sind Ea.hy926 Zellen wurden für 24 h mit Epoxomicin (Epox) oder 0,1 % DMSO behandelt. Im Anschluss wurden die nicht-nukleären von den nukleären Proteinen getrennt und die eventuellen N-Glykosylierungen mit der PNGase F abgespalten. Die Detektion von TCF11/Nrf1 erfolgte mit Hilfe eines Immunoblots und einem gegen beide Proteine gerichteten Antikörper. Die korrespondierenden Blots für GAPDH und LaminB1 sind in Abb. 3.10A abgebildet.

Des Weiteren war zu beobachten, dass die nukleären Formen bei 130 kDa nicht N-glykosyliert waren, da sich das Molekulargewicht nach dem PNGase F Verdau nicht änderte (Abb. 3.17). Der Größenunterschied der nukleären TCF11/Nrf1 zu den nicht-nukleären kann nicht nur durch die fehlende N-Glykosylierung erklärt werden, da die Molekulargewichte noch deutlich unter denen der deglykosylierten nicht-nukleären TCF11/Nrf1 lagen. Die

membrangebundenen TCF11/Nrf1 waren demnach tatsächlich N-glykosylierte Proteine. Dagegen waren die nukleären Formen nicht mehr N-glykosyliert und kleiner.

3.2.3 TCF11/Nrf1 werden durch das 26S Proteasom abgebaut, jedoch ohne Beteiligung von Keap1

Der Abbau des zu TCF11 und Nrf1 homologen Proteins Nrf2 erfolgt durch das Ubiquitin-Proteasom-System. Es besitzt eine Halbwertszeit von ungefähr 15-30 min (Stewart et al. 2003; Chen et al. 2009). Da in vorangegangenen Experimenten die Behandlung von Zellen mit Epoxomicin zu einer starken Akkumulation von TCF11/Nrf1 führte, war ein Abbau von TCF11/Nrf1 durch das UPS sehr wahrscheinlich. Um den Abbau durch das UPS zu bestätigen, wurden Cycloheximid „chase“ Experimente durchgeführt (Abb. 3.18).

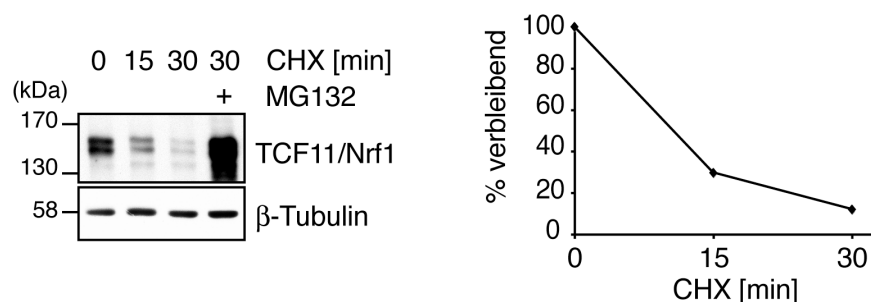


Abb. 3.18: TCF11/Nrf1 werden unter physiologischen Bedingungen durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut Ea.hy926 Zellen wurden für 0, 15 und 30 min mit 50 μg/ml Cycloheximid behandelt und der Abbau von TCF11/Nrf1 im Immunoblot verfolgt. Um zu zeigen, dass TCF11/Nrf1 proteasomal abgebaut werden, wurden die intrazellulären Proteasomen 45 min vor der Cycloheximid (CHX) Zugabe mit 10 μM MG132 gehemmt. Die densitometrische Analyse der TCF11/Nrf1 Signale erfolgte mit ImageJ. Die TCF11/Nrf1 Signale wurden gegen die β-Tubulin Signale abgeglichen.

Die Degradation von TCF11/Nrf1 wurde über einen Zeitraum von 30 min verfolgt, da ähnlich zu Nrf2 ebenfalls eine sehr kurze Halbwertszeit erwartet wurde. Die Proteasomabhängigkeit wurde durch die Hemmung des Proteasoms mit MG132 bestimmt. TCF11/Nrf1 wurden sehr schnell abgebaut. Die Halbwertszeit lag bei ca. 12 min (Abb. 3.18). Durch die Proteasominhibition mit MG132 war der Abbau deutlich gehemmt.

Der Abbau von Nrf2 wird durch das Protein Keap1 reguliert (Itoh et al. 1999). Keap1 interagiert mit dessen N-terminaler Neh2-Domäne und vermittelt dadurch die Ubiquitinierung von Nrf2 durch einen Cullin3 Ubiquitinligase-Komplex (Kobayashi et al. 2004a). Für die Interaktion von Keap1 und Nrf2 sind zwei Sequenzmotive in der Neh2-Domäne im Nrf2 Protein verantwortlich. Das DLG-Motiv bindet mit geringer und das ETGE-Motiv mit hoher Affinität an die Kelch Domänen von Keap1. TCF11 und Nrf1 besitzen in ihrer Neh2-ähnlichen Domäne ebenfalls diese Sequenzmotive (Abb. 1.11). In yeast two-hybrid- und

Koimmunpräzipitations-Analysen wurde gezeigt, dass Nrf1 mit Keap1 interagieren kann und dass die Interaktion über die Neh2-ähnliche Domäne vermittelt wird (Kobayashi et al. 2004b; Wang and Chan 2006). Jedoch hatte Keap1 keinen Einfluss auf die durch Nrf1 vermittelte Aktivierung von ARE regulierten Genen, so wie es bei Nrf2 der Fall ist (Zhang et al. 2006; Zhang et al. 2009b). Um die Interaktion von TCF11 und Nrf1 mit Keap1 zu bestätigen, wurden TCF11-V5 bzw. Nrf1-V5 zusammen mit myc-Keap1 in Ea.hy926 Zellen überexprimiert. Anschließend wurde Keap1 mit einem gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörper immunpräzipitiert und die Assoziation von TCF11-V5 bzw. Nrf1-V5 mit Keap1 im Immunoblot untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl TCF11 als auch Nrf1 in der Tat mit Keap1 interagieren können (Abb. 3.19A).

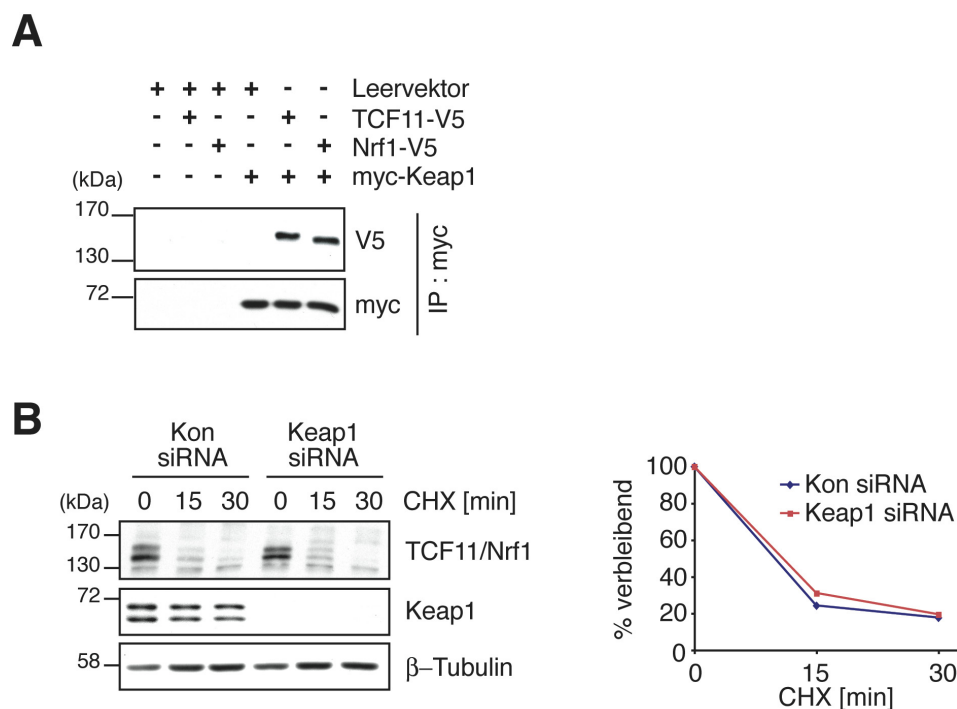


Abb. 3.19: Der Abbau von TCF11/Nrf1 erfolgt über einen Keap1 unabhängigen Mechanismus A) Ea.hy926 Zellen wurden mit einem Leervektor, TCF11-V5, Nrf1-V5 oder myc-Keap1 jeweils allein oder in den dargestellten Kombinationen für 24 h transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und das myc-markierte Keap1 wurde mit einem gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörper immunpräzipitiert. Die koimmunpräzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion von TCF11, Nrf1 und Keap1 erfolgte mit einem Immunoblot und den dargestellten Antikörpern. B) Ea.hy926 Zellen wurden für 48 h mit einer Kontroll siRNA (Kon siRNA) oder einer siRNA gegen Keap1 transfiziert und anschließend mit Cycloheximid (CHX) (50 μ g/ml) für 0, 15 und 30 min behandelt. Der Abbau von TCF11/Nrf1 wurde im Immunoblot sichtbar gemacht und mit ImageJ densitometrisch ausgewertet.

Ob Keap1 unter physiologischen Bedingungen am Abbau von membrangebundenen TCF11 und Nrf1 beteiligt ist, wurde wiederum mittels eines Cycloheximid „chase“ Experimentes analysiert. In diesem wurde deutlich, dass Keap1 keinen Einfluss auf den Abbau von

TCF11/Nrf1 hatte, da TCF11/Nrf1 unter verminderter Keap1 Expression genauso schnell abgebaut wurden wie nach Transfektion einer unspezifischen Kontroll siRNA (Kon siRNA) (Abb. 3.19B).

3.2.4 Einfluss der ER-assoziierten Protein Degradation auf den Abbau von TCF11 und Nrf1

Die ER-assoziierte Protein Degradation ist die Abbaumaschinerie für nicht korrekt gefaltete oder beschädigte ER-ständige oder sekretorische Proteine (Brodsky and Wojcikiewicz 2009).

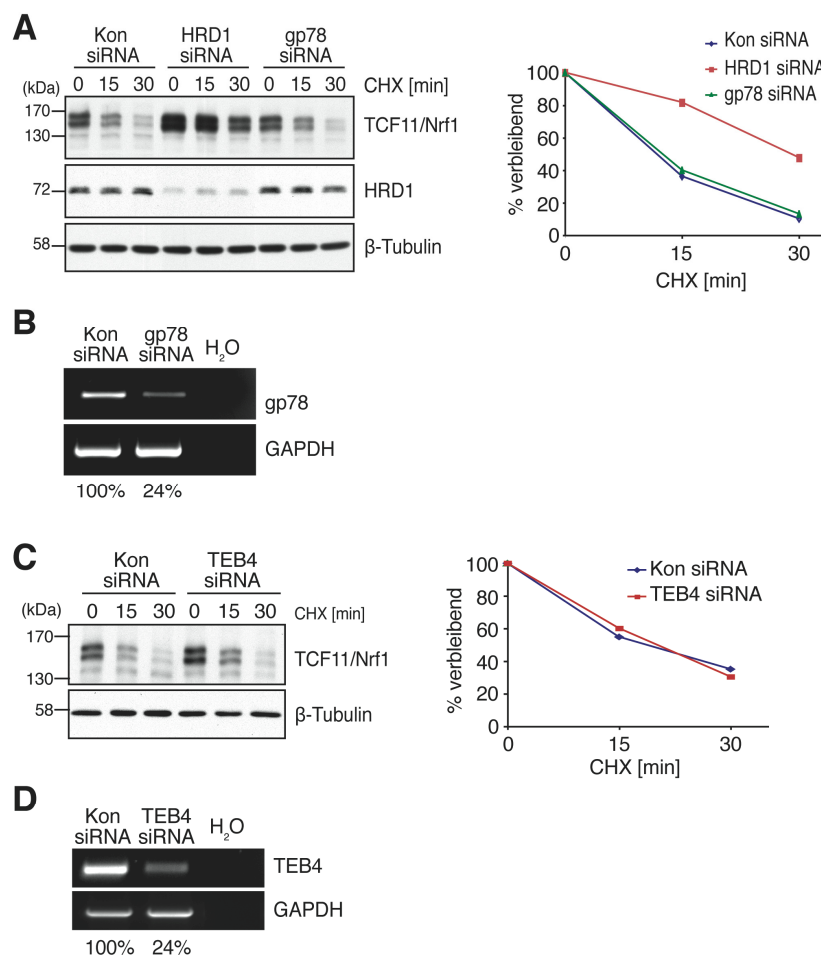


Abb. 3.20: Das im ERAD involvierte membranständige RING-E3-Enzym HRD1 ist unter physiologischen Bedingungen am Abbau von TCF11/Nrf1 beteiligt A) Mit siRNAs wurden die Expressionen der RING-E3-Enzyme HRD1 und gp78 verringert. Die Transfektion der siRNAs erfolgte für 54 h. Anschließend wurden die Zellen mit 50 μ g/ml Cycloheximid (CHX) für 0, 15 und 30 min behandelt und mittels Immunoblot und einem Antikörper gegen TCF11/Nrf1 deren Abbau analysiert. Die densitometrische Analyse der TCF11/Nrf1 Signale erfolgte mit ImageJ. Die TCF11/Nrf1 Signale wurden gegen die β -Tubulin Signale normiert. B) RT-PCR zur Visualisierung der Funktionalität der siRNA gegen gp78. GAPDH diente als Standard. C) Ea.hy926 Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA (Kon siRNA) oder einer siRNA gegen die Ubiquitin-Ligase TEB4 für 54 h transfiziert. Im Anschluss wurde der Abbau von TCF11/Nrf1 mittels Cycloheximid „chase“ und Immunoblot untersucht. D) RT-PCR zur Visualisierung der Funktionalität der siRNA gegen TEB4. GAPDH diente als Standard.

Darüber hinaus werden aber auch korrekt gefaltete ER-ständige Proteine, die nicht mehr gebraucht werden, über den ERAD Weg reguliert abgebaut. Da TCF11 und Nrf1 ER-ständige Membranproteine sind, lag die Frage nahe, ob sie vielleicht über den ERAD Weg abgebaut werden.

Die wichtigsten E3-Enzyme im ERAD Weg sind die RING-Finger Proteine HRD1, gp78 und TEB4, die am Abbau des Großteils der bekannten ERAD Substrate beteiligt sind. Daher wurden deren Expressionen mit spezifischen siRNAs reduziert und der Abbau von TCF11/Nrf1 mittels Cycloheximid „chase“ untersucht. Die Expressionen der drei E3-Enzyme ließen sich durch die verwendeten siRNAs verringern (Abb. 3.20A,B,D). Die Funktionalität der gegen gp78 und TEB4 gerichteten siRNAs konnte durch eine RT-PCR aufgezeigt werden (Abb. 3.20B,D). Während die minimierten Expressionen von gp78 und TEB4 keinen Einfluss auf den TCF11/Nrf1 Abbau zeigten, führte die Verringerung der HRD1 Expression zu einem deutlich verzögerten Abbau von TCF11/Nrf1 (Abb. 3.20A,C).

Um den Einfluss von HRD1 auf den Abbau von TCF11/Nrf1 zu bestätigen, wurde entweder Wildtyp HRD1 oder dominant negatives HRD1-C329S in Ea.hy926 Zellen überexprimiert und der Abbau im Cycloheximid „chase“ analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Überexpression von Wildtyp HRD1 den Abbau von TCF11/Nrf1 leicht beschleunigte, während die dominant negative Mutante HRD1-C329S die Degradation verlangsamte (Abb. 3.21). Die dominant negative HRD1 Mutante HRD1-C329S besitzt einen Aminosäureaustausch in ihrer RING-Domäne, was die Bindung des E2-Enzyms verhindert.

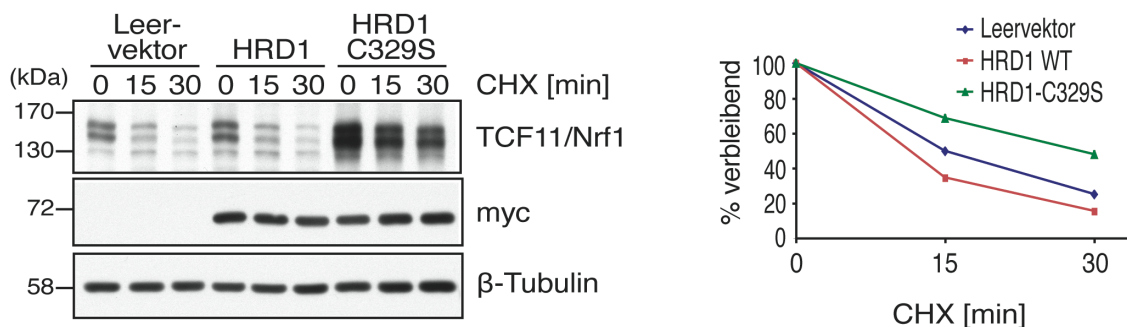


Abb. 3.21: Die Überexpression von Wildtyp HRD1 beschleunigt und die von dominant negativem HRD1-C329S verlangsamt den Abbau von TCF11/Nrf1. In Ea.hy926 Zellen wurde entweder Wildtyp HRD1-myc oder dominant negatives HRD1-C329S-myc für 48 h überexprimiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Cycloheximid (CHX) (50 µg/ml) für 0, 15 und 30 min behandelt. Zur Visualisierung des TCF11/Nrf1 Abbaus wurde ein Immunoblot mit einem Antikörper gegen TCF11/Nrf1 angefertigt. Ein Immunoblot gegen β-Tubulin diente als Ladekontrolle. Für die Bestimmung der Abbaukinetik wurden die TCF11/Nrf1 und β-Tubulin Signale mit ImageJ densitometrisch ausgewertet und gegeneinander normalisiert.

Um zu zeigen, dass der Abbau von TCF11/Nrf1 tatsächlich auf deren Ubiquitinierung durch HRD1 beruht, wurden *in vivo* Ubiquitinierungsexperimente durchgeführt. Dafür wurden

Ea.hy926 Zellen mit Expressionskonstrukten für HA- und GFP-markiertes Ubiquitin, TCF11, myc-markiertes Wildtyp HRD1 und myc-markiertes dominant negatives HRD1 (HRD1-C329S) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und überexprimiertes und ubiquitiniertes TCF11 wurde mit einem TCF11/Nrf1 Antikörper immunpräzipitiert. Die Detektion des präzipitierten und ubiquitinierten TCF11s erfolgte mittels Immunoblot und einem Antikörper gegen das HA-Epitop, mit dem das Ubiquitin markiert war. Während die Überexpression von Wildtyp HRD1 zu einer um das 2 fache gesteigerten Ubiquitinierung von TCF11 führte, war die Ubiquitinierung von TCF11 nach der Überexpression von HRD1-C329S um 50 % reduziert (Abb. 3.22). Somit vermittelt HRD1 den TCF11/Nrf1 Abbau durch deren Ubiquitinierung.

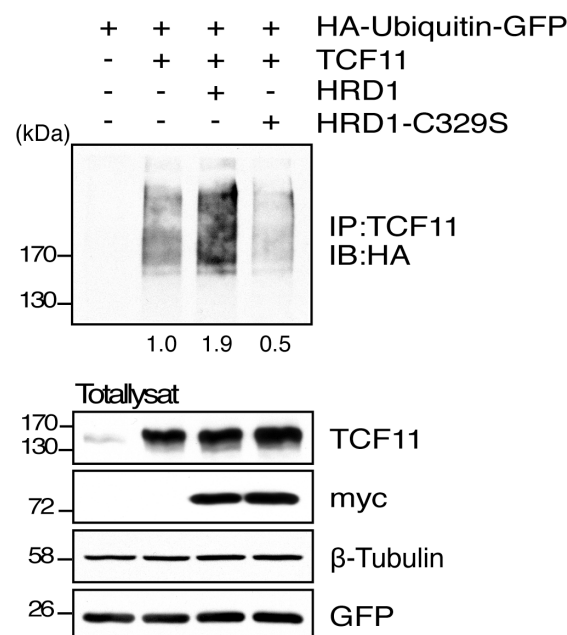


Abb. 3.22: HRD1 ubiquitiniert TCF11 Ea.hy926 Zellen wurden in den dargestellten Kombinationen mit den Expressionsplasmiden für HA-Ubiquitin-GFP, TCF11-Flag, wildtyp HRD1-myc und HRD1C329S-myc für 24 h transfiziert. Anschließend wurden die Zellen 6 h mit dem Proteasominhibitor MG132 (10 µM) behandelt, um den Abbau von TCF11 zu stoppen. Zur Denaturierung von DUBs und Proteasomen wurden die Zellen in SDS-Lysepuffer aufgekocht. Anschließend wurde das ubiquitinierte überexprimierte TCF11-Flag mit einem TCF11/Nrf1 Antikörper präzipitiert und mit einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion des ubiquitinierten TCF11-Flag erfolgte im Immunoblot mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop. Die Immunoblots gegen GFP (Transfektionskontrolle), β-Tubulin (Ladekontrolle), myc (Expressionskontrolle von HRD1-myc und HRD1-C329S-myc) und TCF11 (Expressionskontrolle von TCF11-Flag) dienten als Kontrollen.

Ein im ERAD Weg beteiligtes E2-Enzym ist UBE2J1. Um den Einfluss von UBE2J1 auf den TCF11/Nrf1 Abbau zu untersuchen, wurde zunächst dessen Expression durch die RNAi verringert und die Degradation von TCF11/Nrf1 mittels Cycloheximid „chase“ und Immunoblot analysiert. Die Expression von UBE2J1 ließ sich durch die verwendeten siRNAs um über 80 % verringern (Abb. 3.23A). Allerdings hatte die Verringerung der UBE2J1

Expression keine Auswirkung auf den Abbau von TCF11/Nrf1. Die Abbaurrate war im Vergleich zur Kontroll siRNA (Kon siRNA) unverändert. Es war lediglich ein leicht erhöhtes „steady state“ Level zu beobachten (Abb. 3.23A). Zur Bestätigung des Ergebnisses wurde entweder Wildtyp UBE2J1 oder dominant negatives UBE2J1-C91S überexprimiert. Jedoch war auch in diesem Experiment die Abbaurrate von TCF11/Nrf1 gleich bleibend (Abb. 3.23B). Somit ist UBE2J1 nicht das E2-Enzym, das an der Ubiquitinierung und infolgedessen am Abbau von TCF11/Nrf1 beteiligt ist.

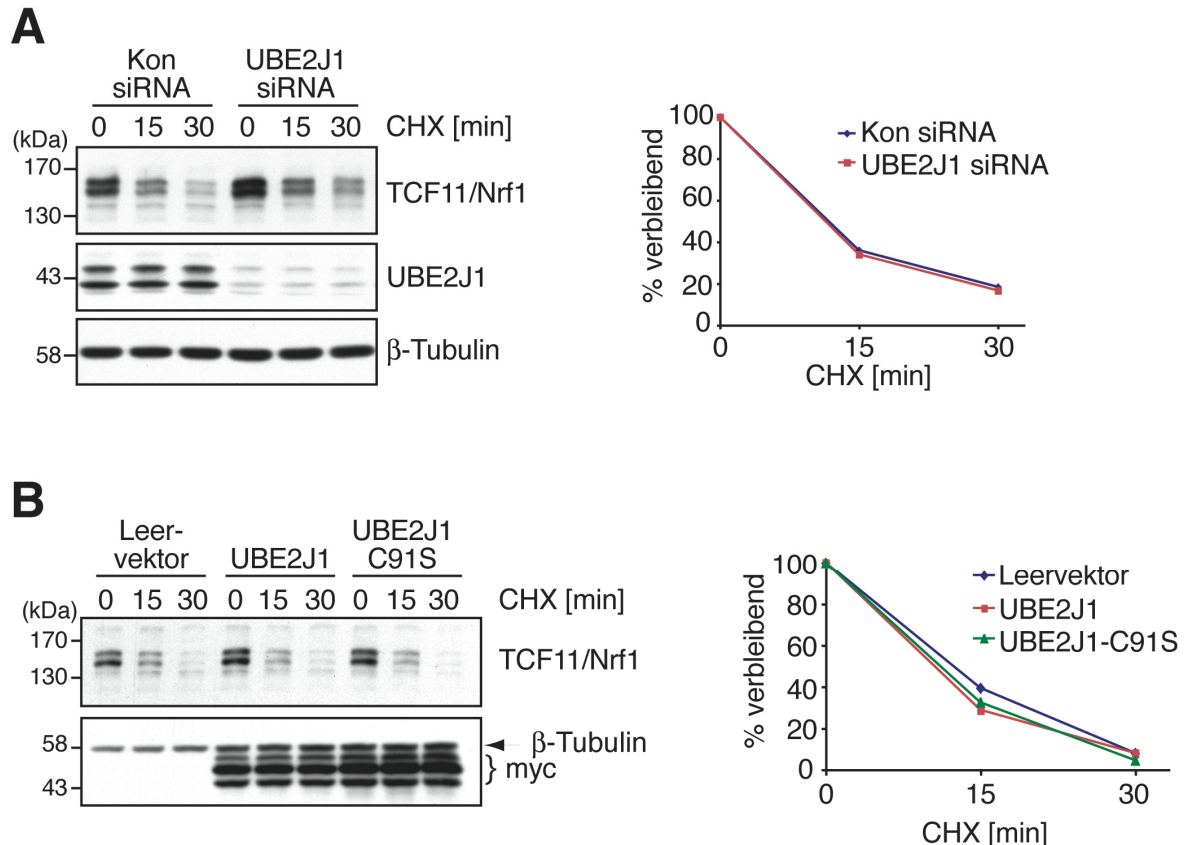


Abb. 3.23: Das Ubiquitin konjugierende Enzym UBE2J1 ist nicht im Abbau von TCF11/Nrf1 involviert A) Ea.hy926 Zellen wurden entweder mit einer unspezifischen Kontroll siRNA (Kon siRNA) oder spezifischen siRNAs gerichtet gegen UBE2J1 (50 nM) transfiziert. Nach 54 h Transfektion wurde der Abbau von TCF11/Nrf1 mit einem Cycloheximid „chase“ (Cycloheximid (CHX) Konzentration 50 µg/ml) und einem Immunoblot untersucht. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ. B) Wie unter A) angeführt, jedoch wurden die Zellen anstatt mit siRNAs entweder mit einem Expressionskonstrukt für Wildtyp UBE2J1-myc oder für dominant negatives UBE2J1-C91S-myc transfiziert.

Das membranständige Protein SEL1L bildet mit HRD1 einen Proteinkomplex (Lilley and Ploegh 2005) und ist in diesem Komplex an der Erkennung von fehlgefalteten Proteinen beteiligt, die durch HRD1 ubiquitiniert werden sollen. Da HRD1 als das E3-Enzym identifiziert wurde, das TCF11/Nrf1 ubiquitiniert und somit deren Abbau vermittelt, sollte untersucht werden, ob SEL1L am Abbau von TCF11/Nrf1 beteiligt ist. Dazu wurde dessen Expression

mittels einer gegen SEL1L gerichteten shRNA verringert und der Abbau von TCF11/Nrf1 mit einem Cycloheximid „chase“ untersucht. Die intrazelluläre SEL1L Menge wurde durch die verwendete shRNA deutlich reduziert (Abb. 3.24A). Jedoch hatte dies keine Auswirkung auf die Degradation von TCF11/Nrf1, da die Abbaurate im Vergleich zu einer gegen EGFP gerichteten shRNA unverändert blieb (Abb. 3.24A).

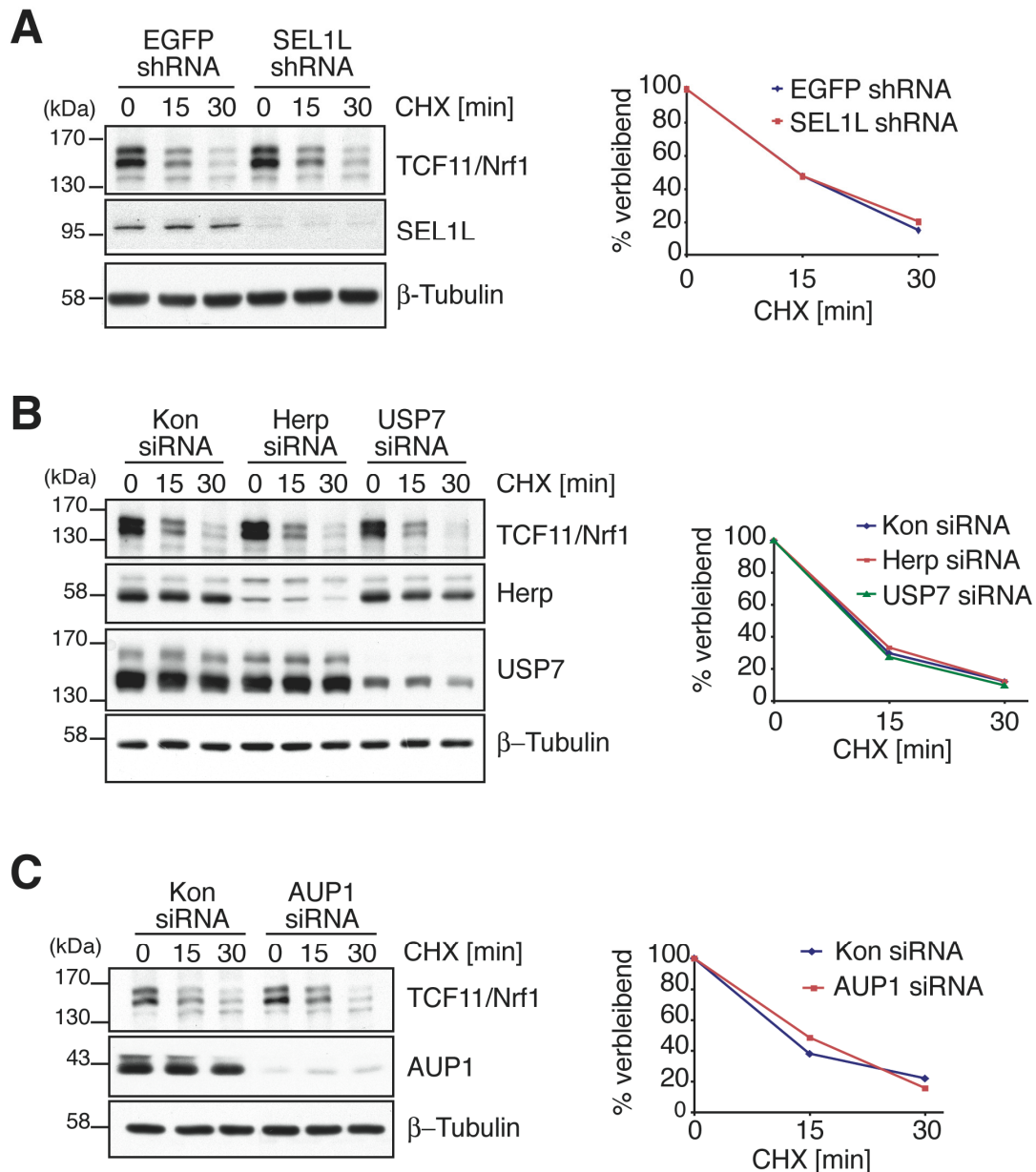


Abb. 3.24: Einfluss verschiedener ERAD Komponenten auf die TCF11/Nrf1 Degradation
Ea.hy926 Zellen wurden entweder für 54 h mit Plasmiden transfiziert, die für shRNAs gerichtet gegen EGFP oder SEL1L kodieren (A) oder für 54 h mit spezifischen siRNAs gerichtet gegen HERP bzw. USP7 (B) oder AUP1 (C). Anschließend wurden die Zellen mit 50 µg/ml Cycloheximid (CHX) für 0, 15 und 30 min behandelt und der Abbau von TCF11/Nrf1 mit einem Immunoblot sichtbar gemacht. Die TCF11/Nrf1 Signale wurden mit ImageJ densitometrisch ausgewertet und mit den β-Tubulin Signalen normalisiert.

Weitere im ERAD involvierte Proteine sind HERP und AUP1. Diese Proteine befinden sich wie SEL1L in Proteinkomplexen mit HRD1 (Schulze et al. 2005; Mueller et al. 2008). Des Weiteren wird das deubiquitinierende Enzym USP7 über die Bindung an HERP an HRD1 Proteinkomplexe rekrutiert (Dissertation Andrea Schulze). Da die drei Proteine Komponenten von HRD1 Proteinkomplexen sind, sollte untersucht werden, ob sie am Abbau von TCF11/Nrf1 beteiligt sind.

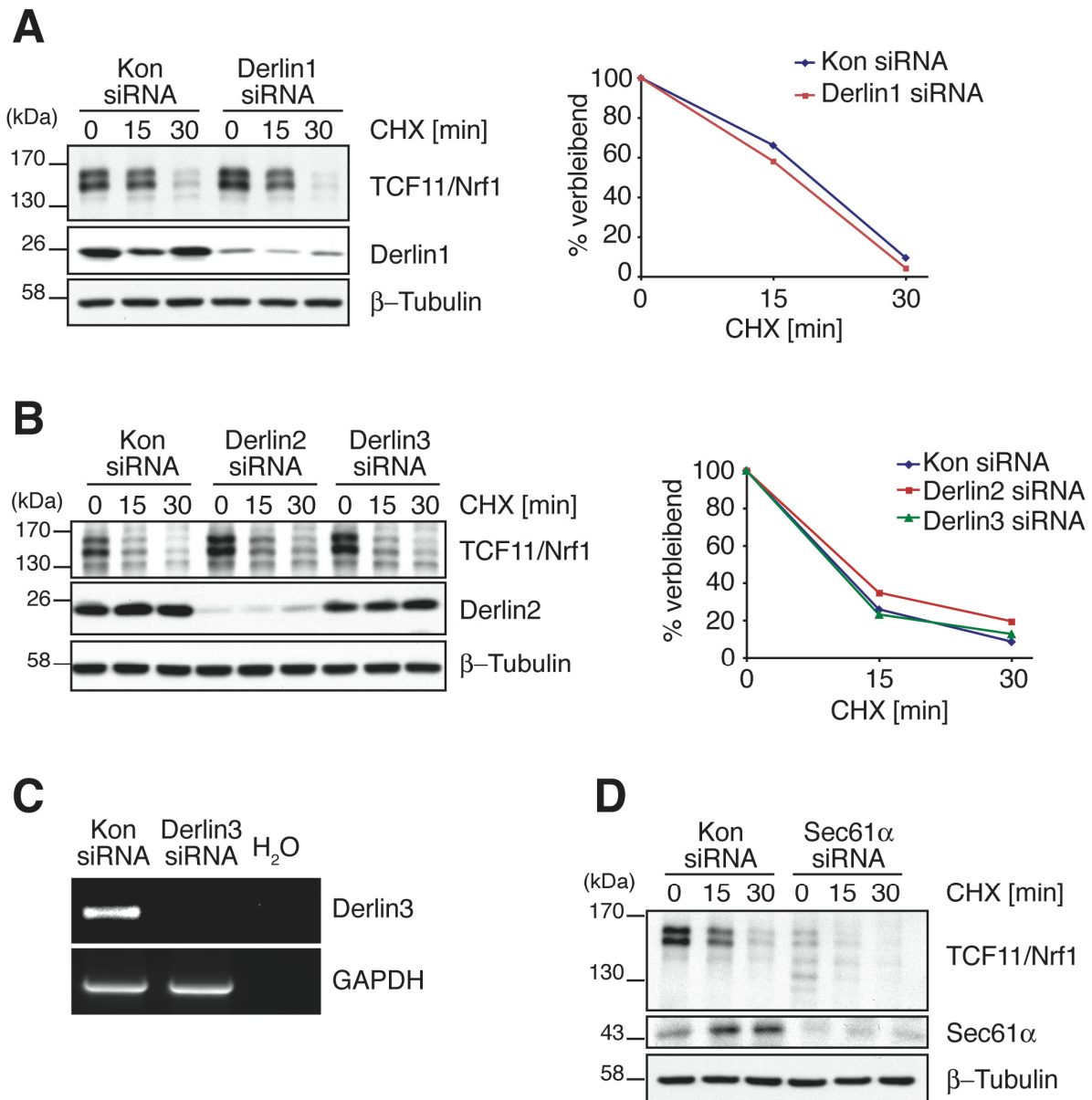


Abb. 3.25: Einfluss der vermeintlichen Komponenten des Retrotranslokationskanals Sec61 α und Derlin1-3 auf den Abbau von TCF11/Nrf1 Ea.hy926 Zellen wurden für 54 h mit gegen Sec61 α (D), Derlin1 (A) oder Derlin2-3 (B) gerichteten siRNAs transfiziert und anschließend mit 50 μ g/ml Cycloheximid (CHX) für 0, 15 oder 30 min behandelt. Der Abbau von TCF11/Nrf1 wurde anhand eines Immunoblots verfolgt. Die TCF11/Nrf1 Signale wurden mit ImageJ densitometrisch ausgewertet und mit den β -Tubulin Signalen normalisiert. C) RT-PCR zur Visualisierung der Funktionalität der gegen Derlin3 gerichteten siRNA. GAPDH diente als Standard.

Dafür wurden Ea.hy926 Zellen mit siRNAs gegen USP7, HERP oder AUP1 transfiziert und mit Cycloheximid für 0, 15 und 30 min behandelt. Der Abbau von TCF11/Nrf1 wurde mit Hilfe eines Immunoblots sichtbar gemacht und dieser zur Bestimmung der Abbauraten densitometrisch ausgewertet. Die Expressionen von HERP, USP7 und AUP1 wurden durch die für sie spezifischen siRNAs deutlich verringert. Der Abbau von TCF11/Nrf1 war jedoch durch die verringerten Expressionen nicht beeinflusst (Abb. 3.24B,C). Somit haben HERP, USP7 und AUP1 keinen Einfluss auf die Degradation von TCF11/Nrf1.

Bevor fehlgefaltete oder nicht mehr benötigte ER-ständige Proteine ubiquitiniert und abgebaut werden können, müssen sie die ER-Membran passieren, da die Ubiquitinierung und der Abbau im Cytosol stattfinden. Dieser Vorgang wird als Retrotranslokation bezeichnet. Da Proteine die hydrophobe Membran nicht von allein passieren können, wird angenommen, dass es dafür einen Kanal gibt. Als mögliche Komponenten des Retrotranslokationskanals werden der Sec61 Komplex und die Proteine Derlin1-3 diskutiert (Wiertz et al. 1996; Ye et al. 2004; Oda et al. 2006). Um zu analysieren, ob diese am Abbau von TCF11/Nrf1 und somit vielleicht an deren Retrotranslokation in das Cytosol beteiligt sind, wurden die Expressionen von Sec61 α , als eine Untereinheit des Sec61 Komplexes, und die der drei Derlin Proteine mit spezifischen siRNAs verringert. Der Verlauf des TCF11/Nrf1 Abbaus wurde erneut mit einem Cycloheximid „chase“ untersucht. Mit den siRNAs konnten die Expressionen von Derlin1, Derlin2 und Sec61 α deutlich reduziert werden (Abb. 3.25A,B,D). Die Effektivität der Derlin3 siRNA wurde auf der RNA Ebene analysiert (Abb. 3.25C). Einen Einfluss auf den TCF11 bzw. Nrf1 Abbau hatten die verringerten Derlin1-3 Expressionen jedoch nicht, da die Abbauraten im Vergleich zur Kontroll siRNA (Kon siRNA) jeweils unverändert waren (Abb. 3.25A,B). Lediglich ein leicht erhöhtes „steady state“ Level von TCF11/Nrf1 war nach der Verringerung der Derlin2 bzw. Derlin3 Expression zu beobachten (Abb. 3.25B). Die verminderte Expression von Sec61 α führte dazu, dass die vermutlich membrangebundenen und N-glykosylierten TCF11/Nrf1 Spezies bei 150 kDa nur sehr schwach nachzuweisen waren. Zusätzlich gab es noch niedermolekulare Formen, die nach der Transfektion der Kontroll siRNA (Kon siRNA) nicht zu detektieren waren (Abb. 3.25D).

Die durch den ERAD Weg polyubiquitinierten Proteine müssen für den Abbau durch das Proteasom aus der ER-Membran extrahiert werden. Dafür wird der cytosolische Proteinkomplex, bestehend aus der hexameren AAA⁺-ATPase p97/VCP und den assoziierten Proteinen UFD1 und NPL4, verantwortlich gemacht. Dieser soll unter ATP Hydrolyse die polyubiquitinierten Proteine aus dem Retrotranslokationskanal ziehen (Ye et al. 2001). TCF11/Nrf1 werden als ER-ständige Membranproteine durch HRD1 ubiquitiniert

und sind daher als mögliche Substrate des p97-UFD1-NPL4-Komplexes denkbar. Um zu untersuchen, ob TCF11/Nrf1 tatsächlich durch den Komplex aus der Membran extrahiert und somit dem Abbau durch das Proteasom zugeführt werden, wurde die Expression von p97 mit Hilfe der RNAi minimiert. Anschließend wurde die Translation mit Cycloheximid inhibiert und der Abbau von TCF11/Nrf1 im Immunoblot analysiert. Die Effizienz der transfizierten siRNAs wurde ebenfalls durch Immunoblotanalysen kontrolliert. Durch die Transfektion der gegen p97 gerichteten siRNA zeigte sich eine signifikante Reduktion der Expression von p97 und ein drastisch verlangsamter Abbau von TCF11/Nrf1 (Abb. 3.26A). Da VIMP das Protein sein soll, dass den p97-UFD1-NPL4-Komplex an HRD1 Komplexe rekrutiert, um die ubiquitinierten Substrate aus der ER-Membran zu extrahieren (Ye et al. 2004), wurde auch dessen Einfluss auf den TCF11/Nrf1 Abbau untersucht. Die Expression von VIMP ließ sich durch die verwendeten gegen VIMP gerichteten siRNAs inhibieren, jedoch hatte dies keinerlei Einfluss auf die Degradation von TCF11/Nrf1 (Abb. 3.26B).

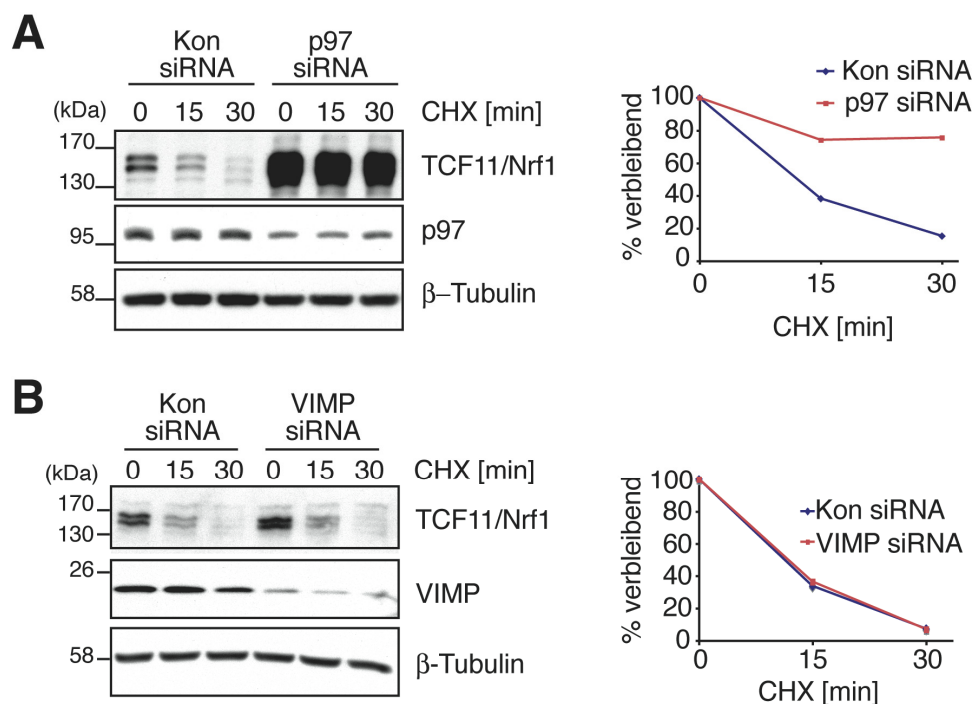


Abb. 3.26: Die AAA⁺-ATPase p97 ist am Abbau von TCF11/Nrf1 beteiligt Ea.hy926 Zellen wurden für 72 bzw. 54 h mit siRNAs gerichtet gegen p97 (A) oder VIMP (B) transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 50 μ g/ml Cycloheximid (CHX) für 0, 15 und 30 min behandelt. Zur Visualisierung des TCF11/Nrf1 Abbaus wurde ein Immunoblot mit einem Antikörper gegen TCF11 /Nrf1 angefertigt. Ein Immunoblot gegen β -Tubulin diente als Ladekontrolle. Für die Bestimmung der Abbaukinetik wurden die TCF11/Nrf1 und β -Tubulin Signale mit ImageJ densitometrisch ausgewertet und gegeneinander normalisiert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass HRD1 und p97 im Gegensatz zu anderen ERAD Komponenten einen wesentlichen Einfluss auf den Abbau von TCF11/Nrf1 haben.

4 Diskussion

4.1 Regulation der proteasomalen Genexpression nach Proteasominhibition

Proteasominhibitoren werden aus pharmazeutischen Gesichtspunkten immer interessanter, da im Vergleich zu nicht entarteten Zellen manche Krebszellen empfindlicher auf die Inhibition des Proteasoms reagieren (Masdehors et al. 1999; Hideshima et al. 2001; Guzman et al. 2002; Boccadoro et al. 2005). Deshalb wird z.B. der Proteasominhibitor Bortezomib (Velcade®) schon heute für die Behandlung von Patienten mit multiplem Myelom eingesetzt. Aufgrund der schnelleren Proliferation von Krebszellen und der damit vermehrt ablaufenden Atmungskette und metabolischen Reaktionen, ist die Menge an ROS in diesen Zellen oft erhöht, was zu einer verstärkt auftretenden Schädigung von Proteinen führen kann. Die beschädigten Proteine müssen abgebaut werden, bevor diese der Zelle schaden. Darum besitzen Krebszellen oft eine gesteigerte Expression der proteasomalen Gene und eine daraus resultierende erhöhte intrazelluläre Proteasomaktivität (Kumatori et al. 1990; Shimbara et al. 1992; Masdehors et al. 2000; Arlt et al. 2009). Meiners und Mitarbeiter konnten zeigen, dass dem Aktivitätsverlust des Proteasoms nach Proteasominhibition normalerweise entgegengewirkt wird, indem alle proteasomalen Untereinheiten verstärkt exprimiert werden und sich diese zu neuen Proteasomen zusammen lagern. Jedoch zeigte die Gebärmutterhalskrebszelle HeLa im Vergleich zu einer primären Zelle eine geringere Expression der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition (Meiners et al. 2003). Infolgedessen könnte die Toxizität von Proteasominhibitoren auf Krebszellen daran liegen, dass die Krebszellen im Anpassungsmechanismus an die Proteasominhibition Defekte besitzen. Andererseits sind einige Patienten mit multiplem Myelom gegenüber dem Proteasominhibitor Bortezomib resistent (Richardson et al. 2003). Darüber hinaus können Krebszellen durch eine langandauernde Behandlung mit Bortezomib Resistenzen gegen diesen Inhibitor entwickeln, z.B. verursacht durch eine verstärkte Expression der proteasomalen Gene (Fuchs et al. 2008). Deshalb ist es von großem Interesse herauszufinden, welcher Transkriptionsfaktor die Transkription der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition reguliert, da dieser als weiteres „Target“ zur Behandlung von Krebs dienen könnte. Während in Hefe der dafür zuständige Transkriptionsfaktor mit Rpn4 bekannt ist (Mannhaupt et al. 1999; Ju et al. 2004), ist er in Säugetierzellen noch nicht identifiziert.

4.1.1 Proteasominhibitoren lösen innerhalb der Zelle oxidativen Stress aus

Einen ersten Hinweis auf den Transkriptionsfaktor, der die Transkription der Standard proteasomalen Gene in Säugetierzellen reguliert, lieferten Kwak und Mitarbeiter mit einer Studie, die zeigen konnte, dass die Expression der murinen Standard proteasomalen Gene bei oxidativem Stress durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 reguliert wird (Kwak et al. 2003). Sollte Nrf2 auch die Expression der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition aktivieren, so müsste die Proteasominhibition auch oxidativen Stress innerhalb der Zelle auslösen, um die Aktivierung von Nrf2 zu bewirken. Durch die Hemmung des Proteasoms mit verschiedenen Inhibitoren kam es in Ea.hy926 Zellen zu einer deutlichen Akkumulation von oxidierten Proteinen (Abb. 3.1). In der Zelle kommt es durch metabolische Reaktionen ständig zur Bildung von ROS. Diese werden zum größten Teil durch die Phase-2-Enzyme oder deren Metabolite beseitigt. Jedoch können die ROS auch Proteine oxidieren. Während die Oxidation von korrekt gefalteten Proteinen und von Proteinen, die sich in Komplexen befinden, keinen Einfluss auf die Konformation und Stabilität hat, bewirkt die Oxidation von neu synthetisierten Proteinen, dass diese sich nicht korrekt falten, aggregieren und durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut werden (Medicherla and Goldberg 2008). Somit verursacht die Proteasominhibition eine Akkumulation dieser Proteine, was für die Zelle Stress bedeutet (Demasi and Davies 2003). Des Weiteren lösen Proteasominhibitoren eine verstärkte Bildung von ROS aus (Perez-Galan et al. 2006), die die Oxidation von Proteinen verstärken können. Folglich verursachen Proteasominhibitoren oxidativen Stress. Da oxidierte Proteine toxisch für die Zelle sind, wird dem Abfall der Proteasomaktivität entgegengewirkt, indem die proteasomalen Gene und zahlreiche im UPS involvierte Gene verstärkt exprimiert werden (Tab. 3.2, Tab. 1 im Anhang, Meiners et al. 2003).

4.1.2 Die humanen proteasomalen Promotoren enthalten ARES

Da die Transkription der murinen proteasomalen Gene bei oxidativen Stress über ARES reguliert wird und die Proteasominhibition auch oxidativen Stress auslöst, wurden in der vorliegenden Arbeit alle humanen proteasomalen Promotoren und der Promotor des Assemblierungshelferproteins POMP durch bioinformatische Methoden auf mögliche ARES analysiert. Es zeigte sich dabei, dass alle Promotoren potentielle ARES enthielten, die mit der Konsensussequenz übereinstimmen (Tab. 3.1). Dies verdeutlicht, dass die ARES, ähnlich zum murinen System, eine wichtige Funktion in der Regulation der proteasomalen Gene besitzen. Bei der Analyse war auffällig, dass in 20 der 33 untersuchten Promotoren ARES in den ersten 500 bp und in 31 Promotoren bis 1000 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart lagen. Somit liegen die ARES in einem relativ engen Bereich in den Promotoren. Obwohl die ARES im murinen PSMB5-Promotor sowohl in der Lage als auch in

der Sequenz nicht mit denen aus dem humanen übereinstimmen, liegen die AREs im murinen PSMB5-Promotor auch in einem Bereich von 500 bp (-341; -51) stromaufwärts vom Transkriptionsstart (Kwak et al. 2003). Eine ähnliche Lokalisation von regulatorischen Sequenzen in den Promotoren von Genen großer Proteinkomplexe könnte ein genereller Regulationsmechanismus für die Transkription dieser Gene sein, da in den ribosomalen Promotoren ebenfalls überrepräsentierte Transkriptionsfaktorbindestellen identifiziert wurden, die relativ ähnlich lokalisiert sind (Roepcke et al. 2006). Normalerweise liegen die Bindestellen für Transkriptionsfaktoren beliebig verteilt in den Promotoren. Ausnahmen sind die Bindestellen für die allgemeinen Transkriptionsfaktoren. So liegt z.B. die TATA-Box, die vom TBP (TATA binding protein), eine Untereinheit des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIID, erkannt wird ca. 25 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart (Burley and Roeder 1996; Pugh 2000).

4.1.3 Alle essentiellen Bindungsstellen der Transkriptionsmaschinerie liegen im PSMB6-Promotor in den ersten 100 Basen stromaufwärts vom Transkriptionsstart

In Reportergermanalysen mit verkürzten PSMB6-Promotorkonstrukten war das Promotorkonstrukt mit einem 100 Basenpaar langem Abschnitt des PSMB6-Promotors (pCAT100) genauso aktiv, wie das mit einem 1500 Basenpaar langem Abschnitt (pCAT1500) (Abb. 3.3). Daraus ist zu schlussfolgern, dass alle essentiellen Transkriptionsfaktorbindestellen in den ersten 100 bp liegen. Die Bindestellen für die allgemeine Transkriptionsmaschinerie liegen sehr wahrscheinlich zwischen den Basenpaaren 60 und 100 im PSMB6-Promotor, da das Promotorkonstrukt pCAT60 im Vergleich zum pCAT100 keinerlei Aktivität zeigte (Abb. 3.3). Dieses besitzt zwar das ARE-17, jedoch kann ohne die Bindung der RNA-Polymerase II und der allgemeinen Transkriptionsfaktoren TFIIA, B, C, D, E, F und H die Transkription nicht erfolgen (Lee and Young 2000). Eine TATA-Box existiert nicht im PSMB6-Promotor, jedoch benötigen TATA-Box freie Promotoren ebenfalls die Bindung des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIID (Pugh and Tjian 1991). Darüber hinaus kommt in TATA-Box freien Promotoren häufiger das BRE^D (downstream TFIIB recognition element) vor. Das BRE^D wird vom allgemeinen Transkriptionsfaktor TFIIB erkannt und liegt in Promotoren mit TATA-Box stromabwärts von dieser, woraus sich der Name ableitet (Deng and Roberts 2005; Deng and Roberts 2006). Zwischen den Basenpaaren 60 und 100 liegt im PSMB6-Promotor eine Sequenz, die nur in einer Position von der BRE^D-Konsensussequenz abweicht (BRE^D-Konsensussequenz: G/A-T-T/G/A-T/G-G/T-T/G-T/G, Sequenz im PSMB6-Promotor: G-T-A-C-T-T-T). Diese könnte die Bindung der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie an den PSMB6-Promotor vermitteln.

Bei einer genaueren Analyse des PSMB6-Promotors konnten zusätzlich zum ARE-17 weitere Sequenzen gefunden werden, die der ARE Konsensussequenz ähnlich waren. Diese unterschieden sich von der Konsensussequenz entweder in der dritten Base (ARE-ähnlich -26) oder in den Basen 8 und 9 (ARE-ähnlich -69 und -135 anstatt dem GC ein AG und ARE-ähnlich -590 anstatt dem GC ein AC) (Abb. 3.2). Jedoch hatten die verschiedenen AREs unterschiedliche Einflüsse sowohl auf die basale als auch auf die durch Proteasominhibition verstärkte Aktivität des PSMB6-Promotors. Die Mutationen der ersten beiden Basen und des Gs aus der GC-Box des ARE-17 führten zu einer starken Abnahme der basalen Expression des Reportergens im Reportergenassay (Abb. 3.4) und darüber hinaus wurde durch die Proteasominhibitoren die Expression nicht mehr gesteigert. In der Konsensussequenz spielen normalerweise die Basen 1-3 (TGA-Motiv, Abb. 4.1) für die Aktivität des AREs eine entscheidende Rolle. Die Mutation von einer der drei Basen bewirkt eine starke Reduktion der basalen und induzierbaren Aktivität. Dagegen führen Mutationen in der GC-Box nur dazu, dass das ARE nicht mehr aktiviert wird (Rushmore et al. 1991).

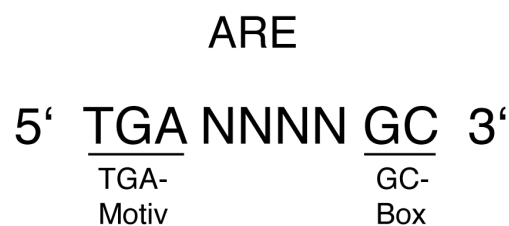


Abb. 4.1: Konsensussequenz des AREs nach Rushmore und Jaiswal (Rushmore et al. 1991; Jaiswal 2004) Markiert sind das TGA-Motiv und die GC-Box.

Von dem Promotor der NAD(P)H-Chinon Oxidoreduktase 1 (NQO1) aus Ratte ist bekannt, dass auch ARE-ähnliche Sequenzen, die anstatt der GC-Box das Dinukleotid AG besitzen, funktionell sind (Favreau and Pickett 1995). Eine Mutation im TGA-Motiv dieses AREs führt, ähnlich wie bei den Mutationen in den ARE-ähnlichen Sequenzen an den Positionen -69 und -135, zu einer deutlich reduzierten basalen Transkription des Reportergens (Abb. 3.4). Jedoch ist der NQO1-Promotor sowie der PSMB6-Promotor immer noch aktivierbar. Die ARE-ähnlichen Sequenzen an den Positionen -26 und -590 besitzen nur einen geringen Einfluss auf die induzierbare Aktivität des PSMB6-Promotors. AREs können auch aktiv sein, wenn sie sich so wie die ARE-ähnlichen Sequenzen an den Positionen -26 und -590 in dem TGA-Motiv von der Konsensussequenz unterscheiden oder ein AC anstatt dem GC enthalten (Kwak et al. 2003; Nioi et al. 2003). Durch die Doppelmutation des ARE-17 und der ARE-ähnlichen Sequenz -69 wurde deutlich, dass sich deren Einflüsse auf die Aktivität des PSMB6-Promotors addieren. Demzufolge sind sie für die Expression der β 1-Untereinheit essentiell, was die hohe phylogenetische Konservierung erklären kann (Abb. 3.2B,C). Nach der Behandlung von Zellen mit 10 nM Epoxomicin über einen Zeitraum von 24 h nahm die

Proteinbindung am ARE-17 deutlich zu (Abb. 3.5A). Dagegen gab es an der ARE-ähnlichen Sequenz an Position -69 zwar eine deutliche Proteinbindung, die sich aber durch Epoxomicin nicht änderte (Abb. 3.5B). Dies entspricht den Ergebnissen der Mutationsanalysen, indem die ARE-ähnliche Sequenz an Position -69 nur einen Einfluss auf die basale Aktivität des PSMB6-Promotors besitzt, während das ARE-17 sowohl die basale als auch die durch Proteasominhibition erhöhte Aktivität des PSMB6-Promotors reguliert. Das häufig verwendete Antioxidant und Nrf2 Aktivator *t*-BHQ führte anders als erwartet nicht zu einer erhöhten Proteinbindung am ARE-17, obwohl die Behandlung von Kolonkarzinomzellen mit *t*-BHQ zu einer Nrf2 abhängigen Expression der proteasomalen Gene führt (Arlt et al. 2009). Allerdings ist von HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) Zellen (Ursprungszellen von Ea.hy926 Zellen) bekannt, dass *t*-BHQ und andere Phenole mit *tert*-Butyl-Gruppe in diesen Zellen zu einer verringerten Expression von α - und einer gleich bleibenden Expression von β -Untereinheiten führt (Takabe et al. 2000; Takabe et al. 2001; Takabe et al. 2006)

4.1.4 Nrf2 und c-Jun sind nicht für die verstärkte Transkription der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition verantwortlich

Neben dem Transkriptionsfaktor Nrf2, der die Transkription der murinen proteasomalen Gene bei oxidativem Stress oder nach der Behandlung von Zellen mit einigen Antioxidantien über AREs aktiviert (Kwak et al. 2003), bindet auch der Transkriptionsfaktor c-Jun zusammen mit Nrf2 oder allein an AREs (Venugopal and Jaiswal 1998; Levy et al. 2009). Beide Transkriptionsfaktoren waren in der Lage, den humanen PSMB6-Promotor zu aktivieren, da die Überexpression der beiden Transkriptionsfaktoren in einer um das 2-3 fache gesteigerten Expression des Reportergens resultierte. Während der experimentellen Phase dieser Arbeit erschien im Jahr 2006 eine Publikation von Kraft und Mitarbeitern, die zeigte, dass die Behandlung von humanen Fibroblasten mit MG132 oder die Überexpression von Nrf2 zu einer erhöhten proteasomalen Aktivität in diesen Zellen führt (Kraft et al. 2006). Kraft und Mitarbeiter geben in ihrer Arbeit aber keinen Hinweis dafür, dass die durch Nrf2 gesteigerte Aktivität nach Proteasominhibition bzw. Überexpression auch tatsächlich auf eine Nrf2 abhängige Expression der proteasomalen Untereinheiten zurückzuführen ist. Allerdings führt die Überexpression von Nrf2 in Kolonkarzinomzellen ebenfalls zu einer erhöhten proteasomalen Aktivität, die aus einer gesteigerten Expression der proteasomalen Gene resultiert (Arlt et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass Nrf2 in Ea.hy926 Zellen weder unter physiologischen Bedingungen noch nach Proteasominhibition die Transkription der endogenen proteasomalen Gene aktiviert (Abb. 3.13A,B), obwohl die Proteasominhibition zur Aktivierung von Nrf2 führt, alle proteasomalen Promotoren AREs enthalten an die Nrf2 teilweise binden kann und die Überexpression von

Nrf2 den PSMB6-Promotor aktiviert. Die 2 fache Aktivierung des PSMB6-Reportergenkonstrukts durch die Nrf2 Überexpression resultiert wahrscheinlich daher, dass die Überexpression zu einer Änderung des Nrf2 Gleichgewichts in der Zelle führt, wodurch Nrf2 in den Zellkern transportiert wird, da ein Großteil der Nrf2 Moleküle nicht abgebaut wird. Zusammen mit MafG bindet Nrf2 im Zellkern an das ARE-17 im PSMB6-Reportergenkonstrukt und aktiviert dadurch den Promotor. Allerdings ist die schwache Aktivierung nur im sehr sensitiven Reportergenassay zu beobachten, denn Nrf2 besitzt in Ea.hy926 Zellen keinen Einfluss auf die Expression der endogenen proteasomalen Gene. Es scheint demnach Unterschiede im Transkriptionsmechanismus zwischen verschiedenen Zellen zu geben. So wurde z.B. gefunden, dass sich die Expression von Nrf2 während der Entwicklung von Krebs verstärkt (Ikeda et al. 2004). Außerdem wurden in Krebszellen zahlreiche Mutationen sowohl in Nrf2 als auch in seinem Inhibitor Keap1 gefunden, wodurch die intrazelluläre Menge von Nrf2 ansteigt (Padmanabhan et al. 2006; Singh et al. 2006; Shibata et al. 2008). Die erhöhte ROS Menge in Krebszellen könnte ebenfalls für eine Aktivierung von Nrf2 führen. Darüber hinaus könnte die Aktivität oder die Spezifität von Nrf2 für bestimmte AREs in den verschiedenen Zelltypen durch assoziierte Proteine gesteuert werden. Der Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinasen p21 bindet z.B. an Nrf2 und verhindert dadurch den Abbau von Nrf2, wodurch die Transkription von Nrf2 Zielgenen gesteigert wird (Chen et al. 2009). P21 wird in einigen Krebszellen verstärkt exprimiert (Abbas and Dutta 2009). Diese Tatsachen könnten die Nrf2 abhängige verstärkte Transkription der proteasomalen Gene in manchen Krebszellen erklären. Andererseits könnte der durch die Proteasominhibition ausgelöste oxidative Stress zwar dazu führen, dass Nrf2 aktiviert wird, dieser aber nicht die Transkription der proteasomalen Gene aktiviert, sondern, dass ein anderer Transkriptionsfaktor die Regulation dieser Gene in Ea.hy926 Zellen übernimmt. Levy und Mitarbeiter zeigten, dass, obwohl Nrf2 nach der Behandlung von humanen bronchialen Epithelzellen mit 4-Hydroxy-2-nonenal im Zellkern akkumuliert, dieses nicht an AREs in einigen Promotoren von Phase-2-Enzymen bindet, obgleich Nrf2 die Transkription dieser Enzyme nach anderen Stimuli reguliert (Levy et al. 2009). Dafür hatte phosphoryliertes c-Jun sehr stark gebunden. In der Leberkrebszelllinie HepG2 konnte dagegen nicht phosphoryliertes c-Jun verstärkt am Promotor der gleichen Phase-2-Enzyme nachgewiesen werden, da 4-Hydroxy-2-nonenal in diesen Zellen nicht die Phosphorylierung von c-Jun bewirkt. Dies verdeutlicht, dass einzelne Zelllinien sehr unterschiedlich auf den gleichen Stimulus reagieren und dass trotzdem ein Stimulus zur Aktivierung von Nrf2 führt, Nrf2 bestimmte ARE enthaltende Promotoren nicht aktiviert, obwohl Nrf2 dies nach anderen Stimuli kann.

Die Behandlung von Ea.hy926 Zellen mit dem Proteasominhibitor Epoxomicin führte zu einer Aktivierung der Kinasen JNK1/2 (Abb. 3.10E). Dies führte zu einer verstärkten Phosphorylierung von c-Jun, worauf dieses im Zellkern akkumulierte (Abb. 3.10D, 3.11C). Allerdings konnte das phosphorylierte c-Jun nicht an AREs der humanen proteasomalen Promotoren binden (Abb. 3.8B, 3.12), obwohl c-Jun an AREs binden kann und so die Transkription aktiviert (Venugopal and Jaiswal 1998; Levy et al. 2009). Im Reporterassay führte die Überexpression von c-Jun zwar zu einer 3-fach gesteigerten Expression des Reportergens, jedoch hatte die Überexpression keine Auswirkung auf die Transkription der endogenen proteasomalen Gene (Abb. 3.9A,B). C-Jun aktiviert die Transkription des PSMB6-Promotorkonstrukts auch nicht über die ARE-ähnliche Sequenz an Position -69, obwohl diese eine Analogie zum CRE besitzt, das z.B. durch das Dimer c-Jun/ATF2 erkannt wird (Abb. 3.7B, (Hai and Curran 1991)). Die Tatsache, dass c-Jun nicht an das ARE-17 binden kann, dieses aber die hauptverantwortliche Sequenz im PSMB6-Promotor ist, über die der PSMB6-Promotor durch Proteasominhibitoren aktiviert wird, und der Befund, dass eine verringerte c-Jun Expression keinen Einfluss auf die Expressionen von proteasomalen Genen nach Proteasominhibition hatte, machen deutlich, dass auch c-Jun nicht die Transkription der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition reguliert (Abb. 3.8B, 3.12, 3.13A,B). Somit verläuft die Aktivierung des PSMB6-Promotors durch c-Jun sehr wahrscheinlich über indirekte Mechanismen. So könnte c-Jun die Expression von Transkriptionsfaktoren regulieren, die an der basalen Transkription des PSMB6 Gens beteiligt sind.

4.1.5 TCF11 ist ein starker Aktivator der Transkription proteasomaler Gene

Durch das Programm MatInspector konnte TCF11 als weiterer möglicher Transkriptionsfaktor identifiziert werden, der an das ARE-17 binden könnte. TCF11 und seine Isoform Nrf1 sind wie Nrf2 Mitglieder der CNC basic leucine zipper Familie und aktivieren über die Bindung an AREs ebenfalls die Transkription von Phase-2-Genen (Chan et al. 1993; Kwong et al. 1999; Myhrstad et al. 2001). Dabei scheint es Präferenzen für bestimmte Gene zu geben, da Nrf2 defiziente Mäuse sich normal entwickeln, aber anfälliger gegen Stress sind, während die Deletion des Gens für Nrf1 embryonal lethal ist (Chan et al. 1996; Chan et al. 1998; Ramos-Gomez et al. 2001). So sind in Mauszellen die Expressionen der Proteine Metallothionein-1 und -2 nur von Nrf1 abhängig, obwohl sowohl das Dimer Nrf2/MafG als auch das Dimer Nrf1/MafG mit gleichen Affinitäten an ein ARE aus dem MT-1 Promotor binden können (Ohtsui et al. 2008). Ähnliche Präferenzen konnten in dieser Arbeit für die Transkription der proteasomalen Gene gefunden werden. Nrf2 war zwar in der Lage, in Ea.hy926 Zellen mit MafG an das ARE-17 im PSMB6-Promotor zu binden, hatte aber nur

einen geringen Einfluss auf die Transkription des PSMB6-Reportergenkonstruktes (Abb. 3.7A, 3.8A). Dagegen führte die Überexpression von TCF11 zu einer 15 fach gesteigerten Aktivierung des PSMB6-Promotors (Abb. 3.7A). TCF11 ist demnach in Ea.hy926 Zellen sehr viel stärker in der Lage den PSMB6-Promotor zu aktivieren. TCF11 aktiviert den PSMB6-Promotor über das ARE-17, da die Mutation dieser Sequenz die durch TCF11 ausgelöste Aktivierung verhindert hatte (Abb. 3.7B) und TCF11 *in vitro* mit seinem beschriebenen Bindungspartner MafG an das ARE-17 binden konnte (Abb. 3.8A, (Toki et al. 1997; Johnsen et al. 1998)).

Im Unterschied zur Überexpression von Nrf2 führte die Überexpression von TCF11 eindeutig auch zu einer Aktivierung der Transkription endogener proteasomaler Gene. Es waren die Transkriptionen der Gene für die meisten α - und Standard β -Untereinheiten, der ATPasen und der nicht-ATPasen erhöht (Tab. 3.2; Abb. 3.9). Die gesteigerte Expression der Standard 20S Proteasomuntereinheiten führte dazu, dass mehr neue 20S Proteasomen gebildet wurden, die alle mit dem Proteasomaktivator PA28 $\alpha\beta$ assoziiert waren (Abb. 3.9C). Darüber hinaus nahm die Menge an 26S, 30S- und Hybrid-Proteasomen signifikant zu. Diese Beobachtungen waren überraschend, da sich die Expressionen von PA28 α und β nach TCF11 Überexpression nicht änderten (Tab. 3.2). PA28 α und β werden ubiquitinär exprimiert. Allerdings ist die Expression in immunologisch relevanten Organen erhöht und wird durch die Behandlung mit dem Zytokin Interferon- γ weiter gesteigert (Realini et al. 1994; Ahn et al. 1995). In dendritischen Zellen werden PA28 α und β unterschiedlich reguliert. Während die Expression von PA28 α sowohl in unreifen als auch in reifen dendritischen Zellen hoch ist, ist die Expression von PA28 β in unreifen gering und nimmt während der Reifung, vermittelt durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B, stark zu (Ossendorp et al. 2005). Basierend auf diesen Ergebnissen und der Tatsache, dass die Assoziation des PA28 $\alpha\beta$ Regulatorkomplexes an das 20S Proteasom mit einer verbesserten Generierung einiger Antigene einherging (Groettrup et al. 1996b; van Hall et al. 2000; Sijts et al. 2002), führte zu der Schlussfolgerung, dass der PA28 $\alpha\beta$ Regulatorkomplex in der Immunantwort involviert ist. Endothelzellen gehören zu den Zellen, die als erste mit Pathogenen konfrontiert werden, da sie direkten Kontakt mit dem Blut haben. Darüber hinaus sind sie an der Immunantwort beteiligt, indem sie z.B. Selektine exprimieren, an denen sich Leukozyten an der Gefäßwand festhalten. Anschließend durchqueren die Leukozyten, die mit Endothelzellen ausgekleidete Gefäßwand, um in das dahinter liegende infizierte Gewebe zu gelangen (Worthylake and Burridge 2001; Lowe 2003; Muller 2003). Außerdem sind Leber Endothelzellen in der Lage, exogene Antigene zu phagozytieren und diese über MHC-Klasse 1 Moleküle CD8⁺ T-Lymphozyten zu präsentieren (Limmer et al. 2000). Diese immunologischen Funktionen der Endothelzellen könnten erklären, warum in Ea.hy926 Zellen alle 20S und ein Großteil der 26S Proteasomen mit PA28 $\alpha\beta$ Regulatorkomplexen assoziiert waren. Die trotz der

unveränderten Expressionen von PA28 $\alpha\beta$ zunehmende Anzahl PA28 $\alpha\beta$ assoziierter Proteasomkomplexe könnte durch eine per se hohe TCF11 unabhängige Expression dieser Proteine in der Endothelzelllinie Ea.hy926 bedingt sein.

Aufgrund der erhöhten Menge neuer Proteasomkomplexe nach der Überexpression von TCF11 nahm auch die Proteasomaktivität eindeutig zu (Abb. 3.9D). Dies veranschaulicht, dass sich die neu synthetisierten Untereinheiten nicht nur zu Proteasomkomplexen zusammen lagern, sondern, dass diese auch funktionell sind. Dies war ein weiteres interessantes Ergebnis, da die Expressionen der Assemblierungshelfer des 20S Proteasoms (PAC1-4) und die des 19S Regulatorkomplexes (S5b, p27, p28) nach der Überexpression von TCF11 unverändert waren. Allein die Expression von POMP nahm zu (Tab. 3.2). Die Assemblierungshelfer sind normalerweise für den korrekten Aufbau von 20S Proteasomen und 19S Regulatorkomplexen wichtig (Hirano et al. 2005; Hirano et al. 2006; Fricke et al. 2007; Le Tallec et al. 2007; Kaneko et al. 2009). Jedoch sind sie anscheinend nicht alle essentiell, da z.B. die Minimierung der Expressionen von S5b, p27 und p28 keine Auswirkungen auf die Vitalität von HEK293 Zellen hat (Kaneko et al. 2009). Demnach können auch ohne Assemblierungshelfer funktionelle 19S Regulatorkomplexe gebildet werden. Die Deletion der zu PAC1 und PAC2 orthologen Proteine in Hefe Poc1 und Poc2 hat ebenfalls keinen Einfluss auf das Zellwachstum. Des Weiteren führen zwar die Deletionen der Orthologen zu PAC3 und PAC4, Poc3 und Poc4 zu einem verlangsamten Wachstum, aber nicht zum kompletten Absterben der Hefezellen (Le Tallec et al. 2007). Für die Proteine PAC1-4 werden in der Arbeit von Le Tallec ähnliche Phänotypen diskutiert, was sich mit Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe deckt (unveröffentlichte Daten von Chan-Schaminet und Krüger). Dagegen führt eine verminderte Expression von POMP zur Apoptose der Zellen (Heink et al. 2005). Diese Ergebnisse verdeutlichen die essentielle Funktion von POMP in der 20S Proteasombiogenese. Deshalb ist POMP wahrscheinlich der einzige Assemblierungshelfer, der nach der Überexpression von TCF11 verstärkt exprimiert wurde. Die Abnahme der Menge von POMP auf Proteinebene lässt sich vermutlich durch eine schnellere Assemblierung der 20S Proteasomen erklären. Dies ist schon von Interferon- γ behandelten Zellen berichtet worden, da POMP vom neu assemblierten 20S Proteasom degradiert wird (Abb. 3.9E, (Heink et al. 2005)).

TCF11 ist ein Mitglied der CNC basic leucine zipper, die als Antwort auf oxidativen Stress aktiviert werden. Da oxidativer Stress zur Anhäufung von beschädigten und oxidierten Proteinen führt und diese toxisch für die Zelle sind, müssen wahrscheinlich schnell mehr Proteasomen gebildet werden, um diese Proteine zu degradieren. Daher reguliert TCF11 nur die proteasomalen Gene und die von POMP, weil vermutlich nur diese für die schnelle Assemblierung benötigt werden. Die Assemblierungshelfer PAC1-4 und auch die des 19S Regulatorkomplexes werden sehr wahrscheinlich dafür gebraucht, um die Fehlerrate bei der

Proteasombiogenese so gering wie möglich zu halten. Dies führt jedoch vermutlich im Vergleich zur Assemblierung ohne Assemblierungshelfer zu einer langsameren Assemblierung (unveröffentlichte Daten von Chan-Schamiet und Krüger). Dies könnte erklären, warum die Überexpression von PAC2 zum verlangsamten Wachstum von Zellen führt (Bahar et al. 2002). Da das Proteasom für den Abbau der Zyklin-abhängigen Kinase Inhibitoren p16, p19, p21 und p27 verantwortlich ist (Chen et al. 2007), könnte eine verlangsamte Assemblierung des 20S Proteasoms, ausgelöst durch die Überexpression von PAC2, den Abbau von p16, p19, p21 und p27 verringern und somit die Proliferation bremsen. Eine Assemblierung ohne die Proteine PAC1-4 könnte Fehler verursachen, die zu permanent aktiven 20S Proteasomen führen könnten, da z.B. der zentrale Eingang des 20S Proteasoms durch nicht korrekt assemblierte α -Ringe offen ist. In Hefe bindet das Protein Blm10 auf beiden Seiten an „offene“ 20S Proteasomen, wodurch diese inaktiviert werden (Lehmann et al. 2008). Für das in Säugetierzellen vorkommende homologe Protein von Blm10, PA200 ist eine ähnliche Funktion denkbar. Dies könnte erklären, warum die Expression von PA200 nach TCF11 Überexpression zunahm. Andererseits soll PA200 aber auch in DNA-Reparaturmechanismen involviert sein, in dem es das Proteasom an die DNA rekrutiert (Ustrell et al. 2002). Da der durch die Proteasominhibition ausgelöste oxidative Stress zu DNA Schäden führen kann und wahrscheinlich die Akkumulation von TCF11 im Zellkern bewirkt (Abb. 3.10A,C, 3.11A,B), könnte TCF11 auch deshalb die Transkription von PA200 regulieren. Allerdings wird die Funktion von PA200 in der DNA-Reparatur noch kontrovers diskutiert.

Die Expression des Proteins Ecm29 war nach der Überexpression von TCF11 ebenfalls erhöht. Ecm29 ist so wie PA200 ein Proteasom assoziiertes Protein, welches in Hefe unter ATP Mangel den 19S Regulatorkomplex mit dem 20S Proteasom verbindet und somit die Stabilität von 26S bzw. 30S Proteasomen aufrechterhält (Leggett et al. 2002; Kleijnen et al. 2007). In Säugetierzellen wird Ecm29 in fast allen Organen exprimiert und soll als Adapterprotein fungieren, das 26S Proteasomen zu zellulären Kompartimenten rekrutiert, die einen erhöhten Bedarf an proteasomaler Aktivität besitzen (Gorbea et al. 2004). Beide Funktionen wären unter Stressbedingungen wichtig und könnten somit die erhöhte Expression nach TCF11 Überexpression erklären.

4.1.6 TCF11 reguliert die Expression der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition

Nach der Proteasominhibition mit nicht toxischen Dosen von Epoxomicin kam es im Vergleich zur TCF11 Überexpression zu einem sehr ähnlichen Expressionsmuster der proteasomalen Gene, der Assemblierungshelfer und der Proteasom assoziierten Proteine PA200 und Ecm29. Dies ist allerdings nicht überraschend, da die Proteasominhibition zur

starken Anhäufung von oxidierten, beschädigten und ubiquitinierten Proteinen und somit zu Stress führt. Um diese Proteine entsorgen zu können, müssen schnell neue aktive Proteasomen hergestellt werden. Deshalb werden nur die proteasomalen Gene und das Assemblierungshelferprotein POMP verstärkt exprimiert, da wahrscheinlich nur diese gebraucht werden. Die Regulation der proteasomalen Gene und der für Ecm29 und PA200 nach Proteasominhibition durch TCF11 war somit sehr wahrscheinlich.

Die humane Zelllinie Ea.hy926 exprimiert TCF11 und seine Isoform Nrf1 in gleichem Maße (Abb. 3.10B). Daher bestand die Möglichkeit, dass sowohl TCF11 als auch Nrf1 die Transkription der proteasomalen Gene regulieren, zumal sowohl TCF11 als auch Nrf1 nach Proteasominhibition im Zellkern akkumulierten (Abb. 3.10A,C, 3.11A,B). Vermutlich ausgelöst durch den entstandenen oxidativen Stress. Jedoch konnte eindeutig gezeigt werden, dass nur TCF11 in der Lage war, den PSMB6-Promotor nach Proteasominhibition zu aktivieren, obwohl unter Kontrollbedingungen die Aktivierungen nach Überexpression von TCF11 oder Nrf1 identisch waren (Abb. 3.15B). Eine Bestätigung dieser Tatsache zeigt sich auch darin, dass TCF11 nach Proteasominhibition im Vergleich zu Nrf1 leicht verstärkt exprimiert wurde (Abb. 3.14C). TCF11 unterscheidet sich von Nrf1 durch ein zusätzliches Exon, indem ein „Nuclear Export Signal“ lokalisiert sein soll (Husberg et al. 2003). Das „Nuclear Export Signal“ hat jedoch sehr wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Aktivität, da TCF11 und Nrf1 ARE enthaltende Promotoren im selben Ausmaß aktivieren können (Abb. 3.15B, (Husberg et al. 2001)). Allerdings scheint das zusätzliche Exon in TCF11 dafür zu sorgen, dass nur TCF11 die Transkription der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition aktivieren kann, womöglich durch Interaktion mit benötigten Proteinen. Dabei war auffällig, dass durch die Überexpressionen von TCF11 bzw. Nrf1 die Expressionen der endogenen Isoformen unterdrückt wurden (Abb. 3.15A). Folglich könnte die Überexpression von Nrf1 dazu führen, dass Nrf1 unter Kontrollbedingungen die Funktion von TCF11 in der Expression der proteasomalen Gene übernehmen kann, jedoch nach Proteasominhibition nur in einem geringen Ausmaß. Die beiden Isoformen TCF11 und Nrf1 könnten in Ea.hy926 Zellen nach Proteasominhibition demnach verschiedene Gene regulieren.

Durch Versuche mit gegen TCF11 gerichteten siRNAs konnte die Funktion von TCF11 in der Regulation der proteasomalen Gene bestätigt werden. Nach verminderter Expression von TCF11 und anschließender Proteasominhibition war die Expression des Reportergens oder endogener proteasomaler Gene im Vergleich zu Zellen, die TCF11 normal exprimieren, erniedrigt (Abb. 3.14A,B,D,E). Zusätzlich gab es in den Zellen weniger neu formiertes 20S Proteasom. Wie schon vermutet, war auch die verstärkte Expression von Ecm29 nach Proteasominhibition eindeutig von TCF11 abhängig (Abb. 3.14). Mit ChIP Versuchen konnte bestätigt werden, dass TCF11 die verstärkte Transkription nach Proteasominhibition über die

Bindung an AREs, z.B. an das ARE-17 aus dem PSMB6-Promotor, steuert (Abb. 3.12). Damit wurde deutlich, dass die erhöhte Transkription der proteasomalen Gene nach Proteasominhibition durch AREs reguliert wird und das TCF11 in der Zelllinie Ea.hy926 der Transkriptionsfaktor ist, der an diese AREs bindet und die Transkription einleitet. Überraschender Weise hatte die verringerte TCF11 Expression keinen Einfluss auf die basale Expression der proteasomalen Gene, obwohl TCF11 auch unter physiologischen Bedingungen an das ARE-17 bindet (Abb. 3.12) und die Mutation dieses AREs zu einer stark erniedrigten Expression des Reportergens führte (Abb. 3.7B). Da jedoch Nrf2 und auch Nrf3, ein weiteres Mitglied der CNC basic leucine zipper und sowie TCF11 ein ER-ständiges Transmembranprotein, an AREs binden können (Itoh et al. 1997; Sankaranarayanan and Jaiswal 2004; Zhang et al. 2009a), besteht die Möglichkeit, dass diese die Funktion von TCF11 unter physiologischen Bedingungen aber nicht nach Proteasominhibition übernehmen können.

4.1.7 Die Transkription der Immuno β -Untereinheiten und die von PA28 α und β ist unabhängig von TCF11

Für die Expressionen der Immuno β -Untereinheiten und von PA28 α und β muss es einen anderen Regulationsmechanismus geben, da diese nach TCF11 Überexpression und Proteasominhibition gleich blieben bzw. abnahmen (Tab. 3.2). So ist bekannt, dass die Behandlung von Zellen mit dem proinflammatorischen Zytokin Interferon- γ eine Stat-1 abhängige verstärkte Expression der Immuno β -Untereinheiten und von PA28 $\alpha\beta$ auslöst (Ahn et al. 1995; Chatterjee-Kishore et al. 2000; Barton et al. 2002; Kloetzel 2004). Darüber hinaus verursacht Interferon- γ die Bildung von ROS und einen kurzfristigen Abfall der proteasomalen Aktivität, da Standard 20S Proteasomen und 19S Regulatorkomplexe für die Ausbildung von Immuno 26S-, 30S- und Hybridproteasomen dissoziieren (Seifert et al.; Watanabe et al. 2003). Jedoch sind im Gegensatz zur Proteasominhibition mit chemischen Inhibitoren die Produktion von ROS nach Interferon- γ Behandlung z.B. zur Bekämpfung von Pathogenen gewollt. Phagozyten produzieren durch die iNOS (inducible nitric oxides synthetase) Nitritoxid um Bakterien abzutöten (Chakravorty and Hensel 2003). Chemische Proteasominhibitoren besitzen demnach eine antiinflammatorische Wirkung, wie dies von Epoxomicin berichtet wird (Meng et al. 1999). Da TCF11 nach Proteasominhibition aktiviert wird und es die Expression der iNOS in Zellen nach der Behandlung mit dem antiinflammatorischen Zytokin TGF- β inhibiert (Berg et al. 2007), wirkt TCF11 somit antiinflammatorisch. Daher kommt es nach Proteasominhibition oder TCF11 Überexpression nicht zur Expression der Immuno β -Untereinheiten und von PA28 $\alpha\beta$, da diese sehr wahrscheinlich nur in inflammatorischen Prozessen für die Degradation der anfallenden oxidierten und ubiquitinierten Proteine gebraucht werden. Immuno 20S-PA28 $\alpha\beta$ -, 26S-, 30S-

und Hybridproteasomen assemblieren im Vergleich zu Standard Proteasomen schneller und sind aktiver (Seifert et al.; Heink et al. 2005).

4.2 Die Modulation der Ubiquitinierungs- bzw. Deubiquitinierungsmaschinerie nach Proteasominhibition und TCF11 Überexpression

Der Ubiquitin Status in Zellen ist sehr dynamisch. Ubiquitinierungen und Deubiquitinierungen sind ständig ablaufende Prozesse in der Zelle, wodurch die Menge an freiem Ubiquitin relativ konstant und gering gehalten wird (Dantuma and Lindsten 2009). Der größte Teil des in der Zelle vorkommenden Ubiquitins ist als Polyubiquitin mit Proteinen verbunden, die abgebaut werden sollen. Kommt es zur Hemmung des Proteasoms, werden diese Proteine nicht mehr abgebaut und die Menge an freiem Ubiquitin nimmt ab, da die Ubiquitinketten nicht von den Proteinen abgetrennt und in Monoubiquitin gespalten werden können. Trotzdem läuft die Ubiquitinierung von beschädigten Proteinen weiter ab. Daher kommt es zur Deubiquitinierung der Histone H2A und H2B, wodurch die Menge an freiem Ubiquitin ansteigt. Dieses Monoubiquitin wird sofort wieder für die Ubiquitinierung von Proteinen genutzt. Die Deubiquitinierung der Histone führt zur Dekondensation der DNA und kann somit die Transkription von Genen verändern (Mimnaugh et al. 1997). Verstärkt exprimierte Gene nach Proteasominhibition sind die Gene von Phase-2-Enzymen, Chaperonen und proteasomalen Untereinheiten (Tab. 3.2, (Meiners et al. 2003; Meiners et al. 2006; Dreger et al. 2009)). Darüber hinaus werden aber auch die Expressionen von E1-, E2- und E3- und deubiquitinierenden Enzymen erhöht. So wurden in dieser Arbeit in Ea.hy926 Zellen nach der Behandlung mit Epoxomicin 1 E1-, 19 E2-, 162 E3- und 32 deubiquitinierende Enzyme verstärkt exprimiert (Tab. 1 im Anhang). Darunter waren z.B. E2- und E3-Enzyme der ER-assoziierten Protein Degradation. Diese sorgen wahrscheinlich zusammen mit den neu gebildeten Proteasomen für die schnelle Degradation der akkumulierten Proteine, um die Homöostase der Zelle wieder herzustellen. Neben der Deubiquitinierung der Histone und der schnellen Spaltung der Polyubiquitinketten von abgebauten Proteinen durch die neu gebildeten DUBs, führt die Expression von Ubiquitin zu einer ausreichenden Menge an Monoubiquitin. Dieses Monoubiquitin könnte dann von den E1-, E2- und E3- Enzymen für die Ubiquitinierung von beschädigten Proteinen genutzt werden.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass 11 E2-, 59 E3- Enzyme und 9 DUBs durch die Überexpression von TCF11 signifikant gesteigert exprimiert wurden (Tab. 1 im Anhang). Diese Enzyme wurden ebenfalls nach Proteasominhibition verstärkt exprimiert, woraus man schlussfolgern kann, dass TCF11 die Expression dieser Enzyme auch nach Proteasominhibition aktiviert. Demnach reguliert TCF11 nicht nur die Expression des 26S Proteasoms, sondern auch die Expression der Enzyme, die die proteasomalen Substrate für

den Abbau markieren. Es war nicht überraschend, dass nicht alle Enzyme durch TCF11 reguliert werden. So ist z.B. für das E3-Enzym HRD1 beschrieben worden, dass dessen Expression nach ER-Stress durch die Transkriptionsfaktoren ATF6 (activating transcription factor 6) und XBP1 (X-box binding protein 1) reguliert wird (Kaneko et al. 2002). Somit könnte die Expression von HRD1 auch durch diese Transkriptionsfaktoren nach Proteasominhibition reguliert werden, was in weiteren Experimenten überprüft werden müsste.

4.3 Lokalisation und Regulation von TCF11 und Nrf1

Im Jahr 2003 beschrieben Husberg und Mitarbeiter TCF11 als cytosolisches und nukleäres Protein. Die Isoform Nrf1 sollte stattdessen vorwiegend im Zellkern lokalisiert sein (Husberg et al. 2003). Erklärt wurde die unterschiedliche Lokalisation durch ein fehlendes NES, wodurch Nrf1 nicht aus dem Zellkern heraus transportiert werden kann. Dagegen zeigten zwei andere Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, dass Nrf1 ein ER-ständiges Membranprotein ist (Wang and Chan 2006; Zhang et al. 2006). Die Membranständigkeit und die Lokalisation von Nrf1 im ER konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Darüber hinaus konnte erstmalig eindeutig gezeigt werden, dass auch TCF11 ein ER-ständiges Membranprotein ist und dass das mögliche NES keine Auswirkung auf die Lokalisation unter physiologischen Bedingungen besitzt (Abb. 3.16). Unterstützt wurde diese Beobachtung durch die Tatsache, dass in humanen Brustkrebszellen die mRNAs für TCF11 und Nrf1 an rauen Polysomen gefunden wurden (Stitzel et al. 2004). Arbeiten von Wang und Zhang zeigten, dass die Aminosäuren 7-24 bzw. 7-26 eine hydrophobe Helix ausbilden, die Nrf1 in der ER-Membran verankert und gleichzeitig auch als potentielle Signalsequenz fungiert (Wang and Chan 2006; Zhang et al. 2007). Eine Deletion dieser Helix führt zu einer dominant nukleären Lokalisation von Nrf1 und somit zu einer verstärkten Aktivierung eines Reportergenkonstrukts mit dem NQO1-Promotor. Eine Fusion des N-terminus von humanem Nrf1 mit dem nukleären Protein Nucleoplasmin aus *Xenopus laevis* verankerte dieses Fusionsprotein in der ER-Membran (Wang and Chan 2006). Während des Einbaus in die Membran erlangen Proteine ihre Topologie. Dabei kann der N-terminale Teil vor der Transmembranhelix entweder cytoplasmatisch (N_{Cyt}/C_{ER}) oder im ER-Lumen (N_{ER}/C_{Cyt}) lokalisiert sein. Diese Orientierung wird weitestgehend durch die Ladung, der die Helix umgebenden Aminosäuren bestimmt. Je positiver die Aminosäuren auf einer Seite sind, desto häufiger ist diese Seite im Cytosol lokalisiert (positive inside rule) (Hartmann et al. 1989; Goder and Spiess 2001). Da Nrf1 auf der N-terminalen Seite der Helix mehr positive Aminosäuren besitzt als auf der C-terminalen Seite, schlussfolgern Zhang und Mitarbeiter, dass die N-terminale Seite im Cytosol liegt (Zhang et al. 2007). Die geschilderte Annahme wird dadurch unterstützt, dass membrangebundenes TCF11 bzw. Nrf1 N-glykosyliert ist

(Abb. 3.17, (Zhang et al. 2007; Zhang et al. 2009b)). Die N-Glykosylierung von Nrf1 erfolgt an Asparaginen in der NST-Domäne (Asparagin, Serin und Threonin reich). Diese Domäne liegt in TCF11 bzw. Nrf1 zwischen den Aminosäuren 326-433 respektive 296-403 und somit C-terminal zur Helix. Die N-Glykosylierung scheint eine positive regulatorische Funktion zu besitzen, da Mutationen der Asparagine zu Glutaminen die Aktivität von Nrf1 herabsetzten. Darüber hinaus besitzt die N-Glykosylierung auch eine negative regulatorische Funktion, denn Nrf1, dessen Asparagine zu Aspartat mutiert wurden, war fast um das 3 fache aktiver als Wildtyp Nrf1 (Zhang et al. 2009b). Die Aspartat-Mutante soll deglykosyliertes Nrf1 simulieren, da Asparagine während der Abspaltung der Zuckerketten in Aspartate umgewandelt werden (Suzuki et al. 2002). Somit muss Nrf1 erst N-glykosyliert und dann deglykosyliert werden, bevor es die Transkription aktivieren kann. Dies bestätigt Ergebnisse dieser Arbeit, dass nukleäres TCF11 bzw. Nrf1 nicht mehr glykosyliert ist (Abb. 3.17). Ein ähnlicher Regulationsmechanismus ist von dem ebenfalls N-glykosylierten ER-ständigen Transkriptionsfaktor ATF6 bekannt. Nach ER-Stress wird ATF6 in den Golgi-Apparat transportiert, in dem ATF6 durch die Proteasen S1P (site-1 protease) und S2P (site-2 protease) gespalten wird (Ye et al. 2000). Anschließend wandert das N-terminale Spaltprodukt, dass die DNA-Binde- und Transaktivierungsdomäne enthält in den Zellkern. Dort bindet es an das „ER stress-response element 1 bzw. 2“ (ERSE1+2) und aktiviert die Transkription von Genen, die in der „unfolded protein reponse“ (UPR) involviert sind (Yoshida et al. 2000). Die N-Glykosylierung von ATF6 scheint auch eine regulatorische Funktion zu besitzen, da Hong und Mitarbeiter zeigen konnten, dass eine Mutante, die nicht mehr N-glykosyliert werden kann, aktiver war als Wildtyp ATF6 (Hong et al. 2004). Während das N-glykosylierte ATF6 in der Lage war mit dem Lektin Calreticulin zu interagieren, konnte dies die Mutante nicht. Interaktionen mit Calnexin oder dem Chaperon GRP78 waren durch die Mutation nicht betroffen. Daher wurde geschlussfolgert, dass unter physiologischen Bedingungen Calreticulin ATF6 im ER festhält. Durch ER-Stress könnte es zur Deglykosylierung von bereits vorhandenem ATF6 oder nicht zur Glykosylierung von neu synthetisiertem ATF6 kommen. Durch die schwächere Interaktion mit Calreticulin würde ATF6 nicht mehr im ER festgehalten und in den Golgi-Apparat transportiert werden. Dort wird ATF6 durch die Proteasen S1P und S2P gespalten und das Spaltprodukt wandert in den Zellkern. Für TCF11 und Nrf1 wäre ein ähnlicher Aktivierungsmechanismus denkbar, da Nrf1 ebenfalls durch die ER-Stress auslösende Chemikalie Tunicamycin aktiviert werden soll (Wang and Chan 2006). Jedoch gibt es zur Aktivierung von Nrf1 durch Tunicamycin in Mäusen widersprüchliche Meinungen (Zhang et al. 2009b). Außerdem ist noch keine Interaktion von TCF11 und Nrf1 mit Calreticulin gezeigt worden und in TCF11 und Nrf1 scheint es keine Schnittstellen für die Proteasen S1P und S2P zu geben (Zhang et al. 2007).

Da die nicht N-glykosylierten nukleären Formen von TCF11 und Nrf1 kleiner waren als die nicht N-glykosylierten in der nicht-nukleären Fraktion (Abb. 3.17), ist eine Spaltung durch eine Protease unabhängig von S1P und S2P wahrscheinlich. Diese müsste ähnlich zu ATF6, TCF11 bzw. Nrf1 durch eine Spaltung von der Membran abtrennen, damit diese in den Zellkern transportiert werden können. Eine andere membranständige Protease, die an der regulierten Intramembran-Proteolyse (RIP) beteiligt ist, ist die γ -Secretase (McCarthy et al. 2009). Diese besteht aus den Proteinen Presenilin-1 oder -2, Nicastrin, PEN-2 (presenilin enhancer-2 protein) und APh-1 (anterior pharynx-1) und ist z.B. für die Spaltung des Proteins Notch an der Plasmamembran verantwortlich. Das daraus resultierende Spaltprodukt wird in den Zellkern transportiert und aktiviert die Transkription (Shih le and Wang 2007). Die γ -Secretase kommt im ER, im Golgi-Apparat und in der Plasmamembran vor (Kim et al. 2000) und spaltet Typ I und Typ II Transmembranproteine und Proteine mit mehreren Transmembrandomänen (Beel and Sanders 2008). Demnach könnte die γ -Secretase die Abtrennung von TCF11 bzw. Nrf1 katalysieren. Darüber hinaus soll es nach Proteasominhibition zu einer erhöhten Aktivität der γ -Secretase kommen (Flood et al. 2005). Folglich könnten TCF11 bzw. Nrf1 nach Proteasominhibition vermehrt von der Membran abgespalten werden. Dies würde die erhöhte Menge an TCF11 und Nrf1 im Zellkern erklären. Jedoch kann auch der verhinderte Abbau von nukleärem TCF11 und Nrf1 durch das Proteasom zu den gesteigerten Mengen führen.

Hingegen bleibt die Frage, wie der, wenn TCF11 und Nrf1 wirklich Typ II Transmembranproteine sind, im ER-Lumen liegende „leucine zipper“ und die für die Transkription wichtige AD1- (acidic domain 1) Domäne in den Zellkern gelangen (Abb. 4.2). In der AD1-Domäne liegen Aminosäuren, die aufgrund von möglichen Interaktionen mit anderen Proteinen für die Aktivität von Nrf1 essentiell sind (Zhang et al. 2009b). Eine Möglichkeit wäre, dass weitere Transmembrandomänen dafür sorgen, dass der „leucine zipper“ und die AD1-Domäne in das Cytosol reichen. Allerdings ist über die Topologie von TCF11 und Nrf1 noch relativ wenig bekannt. Topologie Vorhersageprogramme beschreiben die Aminosäuren 372-392 bzw. 402-422 in Nrf1 respektive TCF11 als weitere potentielle Transmembrandomäne (Daten nicht gezeigt). Durch diese zusätzliche Transmembrandomäne würde der „leucine zipper“ im Cytosol und die AD1-Domäne im ER-Lumen lokalisiert sein (Abb. 4.2). Diese Topologie würde zulassen, dass z.B. die γ -Secretase im Golgi-Apparat den „leucine zipper“ abschneiden und diesen ins Cytosol entlassen kann. Jedoch würde dann die AD1-Domäne fehlen und das entstehende Spaltprodukt wäre kleiner als das nach Proteasominhibition im Zellkern nachweisbare nicht-glykosylierte bei 130 kDa migrierende Fragment (Abb. 3.17). Demnach müssten sich die Topologien von TCF11 und Nrf1 während des Transports vom ER in den Golgi-Apparat ändern, damit nach der Spaltung sowohl der „leucine zipper“ als auch die AD1-Domäne im Spaltprodukt enthalten sind. Lange

Zeit wurde angenommen, dass die Topologie während des Transports nicht wechselt. Jedoch konnten Bogdanov und Mitarbeiter zeigen, dass sich die Topologie von Membranproteinen ändern kann, wenn die Phospholipidzusammensetzungen der Membranen unterschiedlich sind (Bogdanov et al. 2002). Demzufolge könnte die Umstrukturierung von TCF11 und Nrf1 stattfinden, wenn die Golgi- und die ER-Membran verschiedene Phospholipidzusammensetzungen besitzen. Zhang und Mitarbeiter schlagen eine Topologie mit drei Transmembranhelices vor (Abb. 4.2, (Zhang et al. 2009b)).

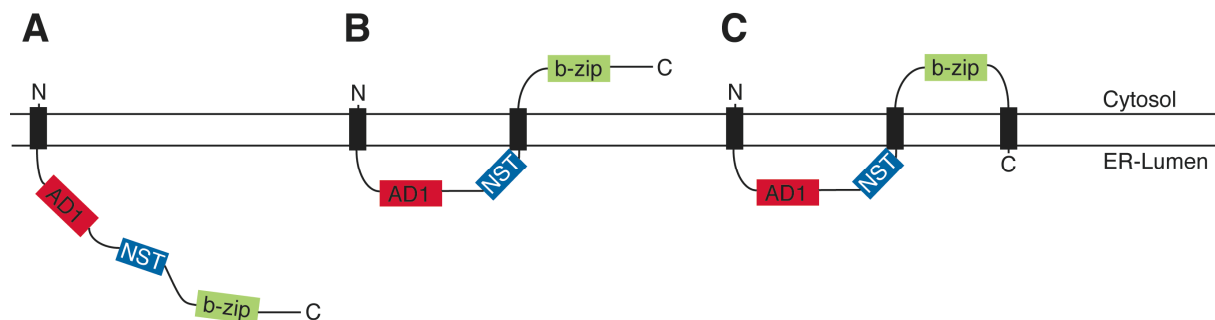


Abb. 4.2: Mögliche Topologien von TCF11/Nrf1

Nrf1 soll zusätzlich noch eine Transmembrandomäne am C-terminus besitzen. Nach dieser Topologie liegen, wie bei der Topologie mit zwei Transmembrandomänen, die NST- und die AD1-Domäne im ER-Lumen und der „leucine zipper“ (bzip) im Cytosol. Allerdings gehen Zhang und Mitarbeiter in ihrem Modell nicht von einem Schnitt aus. Sie vermuten, dass Nrf1 durch einen Importin- α -16 vermittelten Transport entlang der ER-Membran und der Kernpore in die innere Kernmembran transportiert wird (Zhang et al. 2009b). Für Importin- α -16 konnte gezeigt werden, dass es am Transport von Proteinen vom ER in die innere Kernmembran beteiligt ist (Saksena et al. 2006; Braunagel et al. 2007). Importin- α -16 bindet an das „inner nuclear membrane sorting motif“ (INM-SM), das aus geladenen Aminosäuren, die ca. 4-8 Aminosäuren entfernt von der Helix im Cytosol liegen, besteht. TCF11 und Nrf1 besitzen im N-terminus zwei positiv geladene Lysinreste, die als INM-SM fungieren könnten. An der inneren Kernmembran soll es zu Umstrukturierungen von Nrf1 kommen, damit die AD1-Domäne ebenfalls in das Kernplasma ragt. Anschließend bindet Nrf1 an die Promotoren seiner Zielgene, indem die DNA an die innere Kernmembran rekrutiert wird. In Hefe wurde gezeigt, dass transkribierte Gene an der inneren Kernmembran lokalisiert sind. Auf diese Weise kann die mRNA sofort nach der Transkription in das Cytosol transportiert werden (Cabal et al. 2006). Jedoch sind weitere Analysen notwendig, um den von Zhang und Mitarbeitern vorgeschlagenen Mechanismus endgültig zu bestätigen, da publizierte Daten und auch Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diesem Mechanismus widersprechen. So ist das Molekulargewicht der nukleären Formen von TCF11 und Nrf1 nicht nur durch die fehlende N-Glykosylierung zu erklären, da deglykosyliertes und ER-ständiges TCF11 bzw.

Nrf1 größer war (Abb. 3.17). Eine weitere posttranslationale Modifikation könnte während der Translokation von TCF11 bzw. Nrf1 vom ER in die innere Kernmembran entfernt werden, wodurch das Molekulargewicht auch geringer werden könnte. Andere Modifikationen neben der N-Glykosylierung sind aber noch nicht beschrieben. Weiterhin spricht gegen das von Zhang und Mitarbeitern vorgeschlagene Modell, dass die nukleären Formen von TCF11 und Nrf1 durch Hochsalzextraktion aus dem Zellkern isoliert werden konnten. Zwar konnten dadurch auch Proteine mit Farnesyl-Anker, wie LaminB1 isoliert werden, jedoch ist eine Extraktion von Transmembranproteinen aufgrund ihrer hohen Hydrophobizität eher unwahrscheinlich. Letztendlich waren TCF11 und Nrf1 in konfokalen Immunfluoreszenzaufnahmen über den kompletten Zellkern verteilt und nicht nur an der inneren Kernmembran (Abb. 3.11A,B, (Zhang et al. 2009b)). Dies weist ebenfalls eher auf lösliche Formen hin und damit auf eine Abtrennung von TCF11 und Nrf1 von der Membran durch die regulierte Intramembran-Proteolyse. Jedoch ist damit das Modell, dass nukleäres TCF11 und Nrf1 Proteine der inneren Kernmembran sind, nicht gänzlich ausgeschlossen.

4.4 Die Degradation von TCF11 und Nrf1 erfolgt unter physiologischen Bedingungen durch den ERAD Weg und nicht über einen Keap1 abhängigen Mechanismus

Der Transkriptionsfaktor Rpn4, der die Transkription der proteasomalen Untereinheiten in Hefe vermittelt (Mannhaupt et al. 1999), ist ein sehr kurzlebiges Protein, das vom 26S Proteasom abgebaut wird. Kommt es zum Abfall der proteasomalen Aktivität, wird Rpn4 aktiviert und sorgt für die Transkription der proteasomalen Gene, damit neue 26S Proteasomen gebildet werden können. Dies führt zu einem negativen „feed-back“ Zyklus, in dem das Protein, das die proteasomale Biogenese induziert, durch die neu assemblierten und gereiften 26S Proteasomen degradiert wird (Xie and Varshavsky 2001; Ju et al. 2004). In der humanen Zelllinie Ea.hy926 werden TCF11 und seine Isoform Nrf1 unter physiologischen Bedingungen ebenfalls schnell durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut (Abb. 3.18), wodurch die Mengen an TCF11 und Nrf1 gering gehalten werden. Wird das Proteasom z.B. durch den Proteasominhibitor Epoxomicin gehemmt, wird TCF11 aktiviert (Abb. 3.10, 3.11), wodurch die Transkription der proteasomalen Gene verstärkt stattfindet und neue Proteasomen gebildet werden. Somit ist der Mechanismus ähnlich zu dem der in Hefe abläuft, jedoch sind die Proteine unterschiedlich, da Rpn4 kein Membranprotein ist und keine Homologien zu TCF11 aufweist.

Das zu TCF11 und Nrf1 homologe Protein Nrf2 wird auch durch das Ubiquitin-Proteasom-System schnell abgebaut. Dabei vermittelt das Protein Keap1 die Interaktion mit einem Cullin3 Ubiquitinligase-Komplex, wodurch Nrf2 ubiquitiniert und abgebaut wird. Die Menge wird dadurch ebenfalls gering gehalten (Kobayashi et al. 2004a). Jedoch hat Keap1 keinen

Einfluss auf die Degradation von membrangebundenem TCF11 bzw. Nrf1 (Abb. 3.19B), obwohl TCF11 und Nrf1 mit Keap1 interagieren können und Keap1 am ER vorkommt (Abb. 3.19A, (Watai et al. 2007)). Es konnte für Nrf2 nachgewiesen werden, dass Keap1 nicht nur den Abbau von cytosolischem, sondern auch den von nukleärem Nrf2 steuert. Keap1 wird zusammen mit Cullin3 und Rbx1 in den Zellkern transportiert, wo es an Nrf2 bindet und daraufhin seinen Abbau direkt im Zellkern einleiten soll (Niture and Jaiswal 2009). Andererseits ist beschrieben, dass Keap1 den Export von Nrf2 aus dem Zellkern vermittelt, damit dieses im Cytosol abgebaut werden kann (Sun et al. 2007). In beiden Fällen regelt Keap1 jedoch den Abbau von nukleärem Nrf2 und beendet die Transkription von Nrf2 Zielgenen. Die Beendigung der proteasomalen Genexpression durch TCF11 könnte ebenfalls über diese Vorgänge erfolgen, indem Keap1 an nukleäres TCF11 bindet und den Abbau vermittelt. Allerdings führten Mutationen des DLG- bzw. ETGE-Motivs nicht zu einer erhöhten Transaktivierungsaktivität von Nrf1 (Zhang et al. 2006; Zhang et al. 2009b). Damit bleiben die eigentlichen Funktionen des DLG- und ETGE-Motivs in TCF11 und Nrf1 ungeklärt, da außerdem die Affinität von Keap1 zu TCF11 bzw. Nrf1 um das 3,5 fache schwächer ist als die zu Nrf2 (Kobayashi et al. 2004b).

Der Abbau von membrangebunden ER-ständigen Proteinen erfolgt sowohl in Hefe als auch in Säugetieren in der Regel über die ER-assoziierte Protein Degradation. Die ER-assoziierte Protein Degradation wurde ursprünglich als Abbaumaschinerie für nicht korrekt gefaltete oder beschädigte ER-ständige oder sekretorische Proteine beschrieben (Hirsch et al. 2009). Die Entdeckung, dass der regulierte Abbau der membranständigen 3-hydroxy 3-methylglutaryl Coenzym A Reduktase (HMGR) in Säugetierzellen oder des Transkriptionsfaktors SREBP in Hefe durch den ERAD Weg erfolgt, erweiterte diese Vorstellung (Song et al. 2005; Hughes et al. 2009). Demnach werden auch korrekt gefaltete ER-ständige Proteine, die nicht gebraucht werden, über den ERAD Weg reguliert abgebaut. Zu den wichtigsten Proteinen im ERAD Weg in Säugetieren zählen die E3-Enzyme gp78, TEB4 und HRD1 (Hirsch et al. 2009). Diese RING-E3-Enzyme regulieren die Ubiquitinierung der meisten bekannten ERAD Substrate und vermitteln so deren Abbau. Die Membranproteine HMGR oder Insig sind an der Regulation des Cholesterinhaushalts beteiligt und sind Substrate von gp78 (Song et al. 2005; Lee et al. 2006). TEB4 vermittelt die Ubiquitinierung der 2-Iodothyronin Deiodinase, ein Enzym, das für die Aktivierung des Hormons 3,5,3'-Triiodothyronin verantwortlich ist, welches durch den Transkriptionsfaktor Thyroidhormon-Rezeptor die Genexpression moduliert (Zavacki et al. 2009). HRD1 ist z.B. am Abbau der γ -Secretase Komponente Nicastrin, des Transkriptionsfaktors p53, der T-Zell-Rezeptor-Untereinheit TCR- α und der Hong Kong Mutante des körpereigenen Trypsin Inhibitors α 1-Antitrypsin beteiligt (Kikkert et al. 2004; Yamasaki et al. 2007; Christianson et

al. 2008; Maeda et al. 2009). Mutationen in α 1-Antitrypsin und dem daraus resultierenden schnellen Abbau von diesem Protein begünstigen die Ausbildung von Lungenemphysemen (Sifers et al. 1988). Damit regulieren die E3-Enzyme im ERAD Weg den Abbau von vielen Proteinen, die wichtige Vorgänge in der Zelle steuern. Auch der regulierte und schnelle Abbau von membrangebundenem TCF11 bzw. Nrf1 verläuft über HRD1, da der Abbau nach verringerter HRD1 Expression verzögert erfolgte (Abb. 3.20A). Dagegen hatten gp78 und TEB4 keinen Einfluss auf die Halbwertszeit von TCF11 und Nrf1 (Abb. 3.20A,C). Die Überexpression von dominant negativem HRD1 (HRD1-C329S) hatte eine geringere Ubiquitinierung und dadurch einen verlangsamten Abbau von TCF11 zur Folge (Abb. 3.21, 3.22). Der Aminosäureaustausch in der dominant negativen HRD1 Mutante HRD1-C329 bewirkt eine Strukturänderung der RING-Domäne, da durch das fehlende Cystein die Koordination von zwei Zinkionen gestört ist. Dies verhindert die Bindung des E2-Enzyms an HRD1 und somit die Ubiquitinierung von TCF11. Ein mit HRD1 assoziiertes E2-Enzym ist UBE2J1 (Mueller et al. 2008). Jedoch ist es nicht das E2-Enzym, das mit HRD1 für die Ubiquitinierung und den Abbau von TCF11 und Nrf1 verantwortlich ist. Weder die Verringerung der UBE2J1 Expression noch die Überexpression der Funktionsmutante UBE2J1-C91S hatte Auswirkung auf die Degradation (Abb. 3.23). Für das E2-Enzym UBE2G2 konnte gezeigt werden, dass es *in vitro* Substrate mit HRD1 ubiquitinieren kann (Kikkert et al. 2004) und daher möglicherweise an der Ubiquitinierung von TCF11 und Nrf1 beteiligt ist. Andererseits gibt es in Säugetieren sowohl mit UBE2J2 als auch mit UBE2G1 homologe Proteine zu UBE2J1 bzw. UBE2G2. Für UBE2J2 ist gezeigt worden, dass es mit HRD1 am Abbau der Sgk1 (serum- and glucocorticoid-induced kinase 1) beteiligt sein soll (Arteaga et al. 2006). In yeast-two-hybrid Analysen identifizierten van Wijk und Mitarbeiter UBE2W, UBE2U und UBE2D3 als weitere mögliche E2-Enzyme, die mit HRD1 interagieren können (van Wijk et al. 2009). Interessanterweise ist das Sequenzhomolog zu UBE2D3, UBE2D1, im Abbau des ERAD Substrats CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) involviert (Younger et al. 2004).

In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* bildet das zu HRD1 homologe Protein Hrd1p mit dem Protein Hrd3p einen Proteinkomplex mit einer Stöchiometrie von 1:1. Hrd3p ist in diesem Komplex für die Erkennung von fehlgefalteten Proteinen zuständig, die durch Hrd1p ubiquitiniert werden sollen (Denic et al. 2006). Des Weiteren ist Hrd3p für die Stabilität von Hrd1p verantwortlich, da eine genetische Deletion des Gens für Hrd3p zu einem schnellen Abbau von Hrd1p führt (Plempner et al. 1999; Gardner et al. 2000). In Säugetierzellen gibt es das zu Hrd3p orthologe Protein SEL1L. SEL1L bildet mit HRD1 - so wie Hrd1p und Hrd3p - einen Proteinkomplex mit einer Stöchiometrie von 1:1 (Lilley and Ploegh 2005; Mueller et al. 2006). In diesem Komplex ist es ebenfalls an der Erkennung von fehlgefalteten Proteinen beteiligt. Allerdings gibt es noch keine Hinweise auf eine SEL1L abhängige HRD1 Stabilität,

wie es in Hefe der Fall ist. Dies erklärt vielleicht, warum der Abbau von TCF11 und Nrf1 nicht von SEL1L abhängig ist (Abb. 3.24A). Darüber hinaus bedarf es zur Substraterkennung nicht immer eines weiteren Proteins, da Hrd1p in Hefe auch eigenständig seine Substrate erkennen kann (Sato et al. 2009). So ist die Degradation des orthologen Proteins zur humanen membrangebundenen HMGR, Hmg2p unabhängig von Hrd3p. Außerdem ist für die Degradation der Hmg2p nicht das UDP (ubiquitin-like domain protein) Usa1 notwendig (Sato et al. 2009). Usa1 ist wichtig für die Oligomerisierung von Hrd1p und soll das Hefe Ortholog zum UDP in Säugetieren HERP sein (Carvalho et al. 2006; Horn et al. 2009). Andererseits wird vermutet, dass HERP in Säugetierzellen andere Funktionen besitzt als Usa1 in Hefe (Dissertation M. Kny). So rekrutiert HERP z.B. über seine UBL-Domäne das DUB USP7 an HRD1 Komplexe (Dissertation A. Schulze). Während HERP am Abbau des ERAD Modellsubstrats CD3 δ , eine Untereinheit des T-Zellrezeptors, beteiligt ist, ist die Funktion von USP7 im ERAD Weg noch vollkommen unbekannt (Schulze et al. 2005). Beide Proteine werden allerdings für den Abbau von TCF11 und Nrf1 nicht gebraucht (Abb. 3.24B). Ein weiteres Protein im ERAD Weg, das nicht für den Abbau von TCF11 und Nrf1 benötigt wird und in einem Proteinkomplex mit HRD1 gefunden wurde, ist AUP1 (Abb. 3.24C). Es enthält eine CUE- (coupling of ubiquitin conjugation to endoplasmic degradation) Domäne, die Ubiquitin binden kann (Hurley et al. 2006). Bisher ist die genaue Funktion von AUP1 im ERAD noch nicht aufgeklärt.

Für die Degradation und die Ubiquitinierung von ERAD Substraten müssen diese in das Cytosol transportiert werden, weil beide Prozesse im Cytosol stattfinden. Dieser Transport wird als Retrotranslokation bezeichnet und bedarf sehr wahrscheinlich eines Kanals in der ER-Membran, durch den die Substrate vom ER-Lumen oder der ER-Membran ins Cytosol befördert werden. Zurzeit ist die genaue Zusammensetzung dieses Kanals noch nicht bekannt. Möglich wäre, dass das Sec61 Translokon auch die Retrotranslokation übernimmt (Wiertz et al. 1996; Schafer and Wolf 2009). Allerdings werden auch die Proteine der Derlin Familie für die Retrotranslokation als mögliche Kanalkomponenten diskutiert (Ye et al. 2004; Lilley and Ploegh 2005). In Säugetierzellen umfasst die Derlin Familie drei Mitglieder: Derlin1-3. Derlin1-3 sind ER-ständige Transmembranproteine, die Homo- und Heterooligomere untereinander bilden und somit kanalähnliche Strukturen formen könnten (Lilley and Ploegh 2004; Ye et al. 2004; Oda et al. 2006). Durch diesen Kanal sollen die Substrate durch die ER-Membran transportiert werden. Für die Degradation von TCF11 bzw. Nrf1 sind weder das Sec61 Translokon noch die Proteine Derlin1-3 notwendig. Die Abbauraten waren nach reduzierten Expressionen von Derlin1-3 unverändert (Abb. 3.25A,B). Da jeweils nur die Expression eines Derlin Proteins verringert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, ob sich die einzelnen Derlins in ihren Funktionen ersetzen können. Jedoch scheinen die einzelnen Derlin Proteine verschiedene Funktionen zu besitzen, da der

Abbau der Hong Kong Mutante von $\alpha 1$ -Antitrypsin nur von Derlin 2 und 3 und nicht von Derlin1 abhängig ist (Oda et al. 2006). Eine Verringerung der Sec61 α Expression führte zu drastisch reduzierten Mengen der membrangebundenen TCF11 und Nrf1 Formen bei ca. 150 kDa (Abb. 3.25D), da TCF11 und Nrf1 sehr wahrscheinlich über das Sec61 Translokons kotranslational in die ER-Membran eingebaut werden. Neben diesen Formen gab es niedermolekulare Formen, bei denen es sich vielleicht um fertig translatiertes, aber nicht N-glykosyliertes TCF11 bzw. Nrf1 handelt, weil diese nicht in das ER transportiert wurden. Für Membranproteine bedarf es wahrscheinlich nicht unbedingt eines Retrotranslokationskanals, da in Hefe der Abbau von Hmg2p unabhängig von Der1p und Dmf1p (Orthologe zu Derlin 1-3) und von Sec61 stattfindet (Sato and Hampton 2006). Stattdessen verläuft die Retrotranslokation und der Abbau eines Fusionsproteins von Hmg1p, einer Isoform von Hmg2p, und der Ring Domäne von Hrd1p in einem Hrd1p defizienten Hefestamm identisch im Vergleich zum Wildtyp-Stamm (Garza et al. 2009). Die Retrotranslokation der Hmg2p ist aber abhängig von der AAA⁺-ATPase Cdc48p/p97, von der gezeigt wurde, dass sie mit ihren Kofaktoren NPL4 und UFD1 ERAD Substrate, ATP-abhängig in das Cytosol extrahiert (Ye et al. 2001). Cdc48p/p97 braucht somit nicht unbedingt einen Kanal, um Membranproteine für den Abbau durch das 26S Proteasom im Cytosol aus der Membran herauszuziehen. Der Abbau von TCF11 und Nrf1 verläuft sehr ähnlich zu Hmg2p, da für deren Abbau ebenfalls p97 essentiell ist. Die Abbaurate war nach Verringerung der p97 Expression sehr stark verzögert (Abb. 3.26A). P97 soll in Säugetierzellen z.B. durch VIMP an die ER-Membran rekrutiert werden (Ye et al. 2004). HRD1 kann aber auch direkt mit p97 interagieren (Ye et al. 2005). Dies erklärt wahrscheinlich den p97 abhängigen und VIMP unabhängigen Abbau von TCF11 und Nrf1 (Abb. 3.26B). Doch gibt es noch weitere Proteine, die p97 an die ER-Membran binden. Zu denen gehört das Membranprotein UBXD2, welches p97 über seine UBX-Domäne bindet und mit Ubiquilin-1 am Abbau von ERAD Substraten beteiligt ist (Liang et al. 2006; Lim et al. 2009). Interessanterweise werden beide Proteine durch die Überexpression von TCF11 verstärkt exprimiert (Tab. 1 im Anhang). Da die Degradation von TCF11 bzw. Nrf1 sehr der von Hmg2p in Hefe ähnelt, könnten UBXD2 und Ubiquilin-1 auch an der Degradation von TCF11 und Nrf1 beteiligt sein, da der Abbau von Hmg2p teilweise von den orthologen Proteinen Ubx2p und Dsk2p abhängig ist (Garza et al. 2009). Dsk2 bzw. Ubiquilin-1 vermitteln die Interaktion von p97 gebundenen und ubiquitinierten Substraten für deren Abbau mit dem 26S Proteasom. Allerdings konnte gezeigt werden, dass p97 beim Abbau des ER-ständigen Transmembranproteins Insig-2 direkt die Interaktion von Insig-2 mit dem 26 S Proteasom vermittelt, indem p97 an das 26S Proteasom bindet (Ikeda et al. 2009). Die zuvor diskutierten Ergebnisse der Abbauprobe experimente beziehen sich nur auf membrangebundenes und ER-ständiges TCF11 bzw. Nrf1. Der Abbau von nukleärem TCF11 bzw. Nrf1 könnte, vorausgesetzt, dass sie löslich sind, über einen ähnlichen

Mechanismus ablaufen wie bei Nrf2. So könnten TCF11 und Nrf1 z.B. aus dem Zellkern heraus transportiert und dann im Cytosol abgebaut werden. Dabei stellt sich die Frage, ob der Export von Keap1 abhängig ist, und welche Funktionen die DLG- und ETGE-Motive dabei haben. Wenn nukleäre TCF11 bzw. Nrf1 doch Proteine der inneren Kernmembran sind, wäre es möglich, dass sie zum Abbau zurück in das ER transportiert und durch den ERAD Weg degradiert werden. Beide Abbaumechanismen würden die Formen von TCF11 und Nrf1 in der nicht-nukleären Fraktion erklären, die das gleiche Molekulargewicht wie die nukleären Formen hatten (Abb. 3.17).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in der humanen Zelllinie Ea.hy926 wie in Hefe einen negativen Rückkopplungsmechanismus gibt, der die Integrität des UPS aufrechterhält. Unter physiologischen Bedingungen wird TCF11 durch das E3-Enzym HRD1 ubiquitiniert und anschließend ohne Beteiligung der möglichen Kanalkomponenten Derlin1-3 und Sec61 α von der AAA⁺-ATPase p97 aus der Membran extrahiert und dem 26S Proteasom zum Abbau zugeführt. Dadurch wird die Menge an TCF11 gering gehalten. Nach Proteasominhibition wird TCF11 über einen noch nicht bekannten Mechanismus in den Zellkern transportiert. Die Aktivierung von TCF11 verläuft sehr wahrscheinlich über die regulierte Intramembran-Proteolyse. Im Zellkern aktiviert TCF11 die Transkription der proteasomalen und anderer im UPS involvierten Gene über die Bindung an AREs. Dadurch wird dem Stress, der durch die Proteasominhibition entstanden ist, entgegengewirkt und die zelluläre Homöostase wieder hergestellt. Zu überprüfen bleibt, ob dies ein genereller Mechanismus ist und dieser somit vielleicht für die Resistenz von Krebszellen gegenüber Proteasominhibitoren sorgt oder, ob dieser nur in der Endothelzelllinie Ea.hy926 vorkommt.

5 Literaturverzeichnis

- Abbas, T. and Dutta, A. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* **9**(6): 400-414.
- Ahn, J.Y., Tanahashi, N., Akiyama, K., Hisamatsu, H., Noda, C., Tanaka, K., Chung, C.H., Shibmara, N., Willy, P.J., Mott, J.D., and et al. 1995. Primary structures of two homologous subunits of PA28, a gamma-interferon-inducible protein activator of the 20S proteasome. *FEBS Lett* **366**(1): 37-42.
- Al-Hakim, A.K., Zagorska, A., Chapman, L., Deak, M., Pegg, M., and Alessi, D.R. 2008. Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys(29)/Lys(33)-linked polyubiquitin chains. *Biochem J* **411**(2): 249-260.
- Aravind, L. and Koonin, E.V. 2000. The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination. *Curr Biol* **10**(4): R132-134.
- Arlt, A., Bauer, I., Schafmayer, C., Tepel, J., Muerkoster, S.S., Brosch, M., Roder, C., Kalthoff, H., Hampe, J., Moyer, M.P., Folsch, U.R., and Schafer, H. 2009. Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). *Oncogene*.
- Arteaga, M.F., Wang, L., Ravid, T., Hochstrasser, M., and Canessa, C.M. 2006. An amphipathic helix targets serum and glucocorticoid-induced kinase 1 to the endoplasmic reticulum-associated ubiquitin-conjugation machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(30): 11178-11183.
- Bahar, R., J, O.W., Kawamura, K., Seimiya, M., Wang, Y., Hatano, M., Okada, S., Tokuhisa, T., Watanabe, T., and Tagawa, M. 2002. Growth retardation, polyploidy, and multinucleation induced by Clast3, a novel cell cycle-regulated protein. *J Biol Chem* **277**(42): 40012-40019.
- Baker, R.T. and Board, P.G. 1987. Nucleotide sequence of a human ubiquitin Ub B processed pseudogene. *Nucleic Acids Res* **15**(10): 4352.
- Bakiri, L., Lallemand, D., Bossy-Wetzel, E., and Yaniv, M. 2000. Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *Embo J* **19**(9): 2056-2068.
- Barriere, H., Nemes, C., Du, K., and Lukacs, G.L. 2007. Plasticity of polyubiquitin recognition as lysosomal targeting signals by the endosomal sorting machinery. *Mol Biol Cell* **18**(10): 3952-3965.
- Barton, L.F., Cruz, M., Rangwala, R., Deepe, G.S., Jr., and Monaco, J.J. 2002. Regulation of immunoproteasome subunit expression in vivo following pathogenic fungal infection. *J Immunol* **169**(6): 3046-3052.
- Beel, A.J. and Sanders, C.R. 2008. Substrate specificity of gamma-secretase and other intramembrane proteases. *Cell Mol Life Sci* **65**(9): 1311-1334.
- Berg, D.T., Gupta, A., Richardson, M.A., O'Brien, L.A., Calnek, D., and Grinnell, B.W. 2007. Negative regulation of inducible nitric-oxide synthase expression mediated through transforming growth factor-beta-dependent modulation of transcription factor TCF11. *J Biol Chem* **282**(51): 36837-36844.
- Boccardo, M., Morgan, G., and Cavenagh, J. 2005. Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy. *Cancer Cell Int* **5**(1): 18.
- Bogdanov, M., Heacock, P.N., and Dowhan, W. 2002. A polytopic membrane protein displays a reversible topology dependent on membrane lipid composition. *Embo J* **21**(9): 2107-2116.
- Brannigan, J.A., Dodson, G., Duggleby, H.J., Moody, P.C., Smith, J.L., Tomchick, D.R., and Murzin, A.G. 1995. A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* **378**(6555): 416-419.
- Braun, H.A., Umbreen, S., Groll, M., Kuckelkorn, U., Mlynarczuk, I., Wigand, M.E., Drung, I., Kloetzel, P.M., and Schmidt, B. 2005. Tripeptide mimetics inhibit the 20 S proteasome by covalent bonding to the active threonines. *J Biol Chem* **280**(31): 28394-28401.

- Braunagel, S.C., Williamson, S.T., Ding, Q., Wu, X., and Summers, M.D. 2007. Early sorting of inner nuclear membrane proteins is conserved. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(22): 9307-9312.
- Brodsky, J.L. and Wojcikiewicz, R.J. 2009. Substrate-specific mediators of ER associated degradation (ERAD). *Curr Opin Cell Biol* **21**(4): 516-521.
- Burley, S.K. and Roeder, R.G. 1996. Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem* **65**: 769-799.
- Burri, L., Hockendorff, J., Boehm, U., Klamp, T., Dohmen, R.J., and Levy, F. 2000. Identification and characterization of a mammalian protein interacting with 20S proteasome precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(19): 10348-10353.
- Cabal, G.G., Genovesio, A., Rodriguez-Navarro, S., Zimmer, C., Gadai, O., Lesne, A., Buc, H., Feuerbach-Fournier, F., Olivo-Marin, J.C., Hurt, E.C., and Nehrbass, U. 2006. SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope. *Nature* **441**(7094): 770-773.
- Caramelo, J.J. and Parodi, A.J. 2008. Getting in and out from calnexin/calreticulin cycles. *J Biol Chem* **283**(16): 10221-10225.
- Cardozo, C. 1993. Catalytic components of the bovine pituitary multicatalytic proteinase complex (proteasome). *Enzyme Protein* **47**(4-6): 296-305.
- Carvalho, P., Goder, V., and Rapoport, T.A. 2006. Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell* **126**(2): 361-373.
- Cascio, P., Call, M., Petre, B.M., Walz, T., and Goldberg, A.L. 2002. Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes. *Embo J* **21**(11): 2636-2645.
- Chakravorty, D. and Hensel, M. 2003. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes Infect* **5**(7): 621-627.
- Chan, J.Y., Han, X.L., and Kan, Y.W. 1993. Cloning of Nrf1, an NF-E2-related transcription factor, by genetic selection in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(23): 11371-11375.
- Chan, J.Y., Kwong, M., Lu, R., Chang, J., Wang, B., Yen, T.S., and Kan, Y.W. 1998. Targeted disruption of the ubiquitous CNC-bZIP transcription factor, Nrf-1, results in anemia and embryonic lethality in mice. *Embo J* **17**(6): 1779-1787.
- Chan, K., Lu, R., Chang, J.C., and Kan, Y.W. 1996. NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24): 13943-13948.
- Chanas, S.A., Jiang, Q., McMahon, M., McWalter, G.K., McLellan, L.I., Elcombe, C.R., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Moffat, G.J., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J.D. 2002. Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. *Biochem J* **365**(Pt 2): 405-416.
- Chatterjee-Kishore, M., Wright, K.L., Ting, J.P., and Stark, G.R. 2000. How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *Embo J* **19**(15): 4111-4122.
- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., and Varshavsky, A. 1989. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* **243**(4898): 1576-1583.
- Chen, W., Sun, Z., Wang, X.J., Jiang, T., Huang, Z., Fang, D., and Zhang, D.D. 2009. Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Cell* **34**(6): 663-673.
- Chen, X., Barton, L.F., Chi, Y., Clurman, B.E., and Roberts, J.M. 2007. Ubiquitin-independent degradation of cell-cycle inhibitors by the REGgamma proteasome. *Mol Cell* **26**(6): 843-852.
- Christianson, J.C., Shaler, T.A., Tyler, R.E., and Kopito, R.R. 2008. OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat Cell Biol* **10**(3): 272-282.

- Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H., Ferber, S., and Hershko, A. 1980. Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *J Biol Chem* **255**(16): 7525-7528.
- Ciechanover, A., Finley, D., and Varshavsky, A. 1984. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway and mechanisms of energy-dependent intracellular protein degradation. *J Cell Biochem* **24**(1): 27-53.
- Coscoy, L., Sanchez, D.J., and Ganem, D. 2001. A novel class of herpesvirus-encoded membrane-bound E3 ubiquitin ligases regulates endocytosis of proteins involved in immune recognition. *J Cell Biol* **155**(7): 1265-1273.
- Curran, M.P. and McKeage, K. 2009. Bortezomib: a review of its use in patients with multiple myeloma. *Drugs* **69**(7): 859-888.
- Dahlmann, B., Kopp, F., Kuehn, L., Reinauer, H., and Schwenen, M. 1986. Studies on the multicatalytic proteinase from rat skeletal muscle. *Biomed Biochim Acta* **45**(11-12): 1493-1501.
- Dai, R.M., Chen, E., Longo, D.L., Gorbea, C.M., and Li, C.C. 1998. Involvement of valosin-containing protein, an ATPase Co-purified with IkappaBalpha and 26 S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha. *J Biol Chem* **273**(6): 3562-3573.
- Dantuma, N.P. and Lindsten, K. 2009. Stressing the ubiquitin/proteasome system. *Cardiovasc Res*.
- Davis, R.J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**(2): 239-252.
- Demasi, M. and Davies, K.J. 2003. Proteasome inhibitors induce intracellular protein aggregation and cell death by an oxygen-dependent mechanism. *FEBS Lett* **542**(1-3): 89-94.
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z.J. 2000. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**(2): 351-361.
- Deng, W. and Roberts, S.G. 2005. A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB. *Genes Dev* **19**(20): 2418-2423.
- . 2006. Core promoter elements recognized by transcription factor IIB. *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 6): 1051-1053.
- Denic, V., Quan, E.M., and Weissman, J.S. 2006. A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Cell* **126**(2): 349-359.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R.J. 1994. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**(6): 1025-1037.
- Deshaies, R.J. and Joazeiro, C.A. 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* **78**: 399-434.
- Deveraux, Q., van Nocker, S., Mahaffey, D., Vierstra, R., and Rechsteiner, M. 1995. Inhibition of ubiquitin-mediated proteolysis by the Arabidopsis 26 S protease subunit S5a. *J Biol Chem* **270**(50): 29660-29663.
- Dick, L.R., Cruikshank, A.A., Grenier, L., Melandri, F.D., Nunes, S.L., and Stein, R.L. 1996. Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for clasto-lactacystin beta-lactone. *J Biol Chem* **271**(13): 7273-7276.
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., and Kensler, T.W. 2005. The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem Res Toxicol* **18**(12): 1779-1791.
- Dreger, H., Westphal, K., Wilck, N., Baumann, G., Stangl, V., Stangl, K., and Meiners, S. 2009. Protection of vascular cells from oxidative stress by proteasome inhibition depends on Nrf2. *Cardiovasc Res*.
- Edgell, C.J., McDonald, C.C., and Graham, J.B. 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(12): 3734-3737.
- Fang, S., Ferrone, M., Yang, C., Jensen, J.P., Tiwari, S., and Weissman, A.M. 2001. The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated

- in degradation from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(25): 14422-14427.
- Favreau, L.V. and Pickett, C.B. 1995. The rat quinone reductase antioxidant response element. Identification of the nucleotide sequence required for basal and inducible activity and detection of antioxidant response element-binding proteins in hepatoma and non-hepatoma cell lines. *J Biol Chem* **270**(41): 24468-24474.
- Ferrell, K., Wilkinson, C.R., Dubiel, W., and Gordon, C. 2000. Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem Sci* **25**(2): 83-88.
- Fleming, J.A., Lightcap, E.S., Sadis, S., Thoroddsen, V., Bulawa, C.E., and Blackman, R.K. 2002. Complementary whole-genome technologies reveal the cellular response to proteasome inhibition by PS-341. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(3): 1461-1466.
- Flood, F., Murphy, S., Cowburn, R.F., Lannfelt, L., Walker, B., and Johnston, J.A. 2005. Proteasome-mediated effects on amyloid precursor protein processing at the gamma-secretase site. *Biochem J* **385**(Pt 2): 545-550.
- Frentzel, S., Pesold-Hurt, B., Seelig, A., and Kloetzel, P.M. 1994. 20 S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13-16 S preproteasome complexes. *J Mol Biol* **236**(4): 975-981.
- Fricke, B., Heink, S., Steffen, J., Kloetzel, P.M., and Kruger, E. 2007. The proteasome maturation protein POMP facilitates major steps of 20S proteasome formation at the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep* **8**(12): 1170-1175.
- Fu, H., Reis, N., Lee, Y., Glickman, M.H., and Vierstra, R.D. 2001. Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *Embo J* **20**(24): 7096-7107.
- Fuchs, D., Berges, C., Opelz, G., Daniel, V., and Naujokat, C. 2008. Increased expression and altered subunit composition of proteasomes induced by continuous proteasome inhibition establish apoptosis resistance and hyperproliferation of Burkitt lymphoma cells. *J Cell Biochem* **103**(1): 270-283.
- Fuchs, S.Y., Dolan, L., Davis, R.J., and Ronai, Z. 1996. Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase. *Oncogene* **13**(7): 1531-1535.
- Fuda, N.J., Ardehali, M.B., and Lis, J.T. 2009. Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo. *Nature* **461**(7261): 186-192.
- Funakoshi, M., Tomko, R.J., Jr., Kobayashi, H., and Hochstrasser, M. 2009. Multiple assembly chaperones govern biogenesis of the proteasome regulatory particle base. *Cell* **137**(5): 887-899.
- Gao, Y., Lecker, S., Post, M.J., Hietaranta, A.J., Li, J., Volk, R., Li, M., Sato, K., Saluja, A.K., Steer, M.L., Goldberg, A.L., and Simons, M. 2000. Inhibition of ubiquitin-proteasome pathway-mediated I kappa B alpha degradation by a naturally occurring antibacterial peptide. *J Clin Invest* **106**(3): 439-448.
- Gardner, R.G., Swarbrick, G.M., Bays, N.W., Cronin, S.R., Wilhovsky, S., Seelig, L., Kim, C., and Hampton, R.Y. 2000. Endoplasmic reticulum degradation requires lumen to cytosol signaling. Transmembrane control of Hrd1p by Hrd3p. *J Cell Biol* **151**(1): 69-82.
- Garza, R.M., Sato, B.K., and Hampton, R.Y. 2009. In vitro analysis of Hrd1p-mediated retrotranslocation of its multspanning membrane substrate 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase. *J Biol Chem* **284**(22): 14710-14722.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., and Finley, D. 1998a. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* **94**(5): 615-623.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fried, V.A., and Finley, D. 1998b. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* **18**(6): 3149-3162.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fu, H., Larsen, C.N., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Vierstra, R., Baumeister, W., Fried, V., and Finley, D. 1999. Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol Biol Rep* **26**(1-2): 21-28.

- Goder, V. and Spiess, M. 2001. Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Lett* **504**(3): 87-93.
- Goldstein, G. 1974. Isolation of bovine thymim: a polypeptide hormone of the thymus. *Nature* **247**(5435): 11-14.
- Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D.H., Niall, H.D., and Boyse, E.A. 1975. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(1): 11-15.
- Gorbea, C., Goellner, G.M., Teter, K., Holmes, R.K., and Rechsteiner, M. 2004. Characterization of mammalian Ecm29, a 26 S proteasome-associated protein that localizes to the nucleus and membrane vesicles. *J Biol Chem* **279**(52): 54849-54861.
- Groettrup, M., Kraft, R., Kostka, S., Standera, S., Stohwasser, R., and Kloetzel, P.M. 1996a. A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur J Immunol* **26**(4): 863-869.
- Groettrup, M., Soza, A., Eggers, M., Kuehn, L., Dick, T.P., Schild, H., Rammensee, H.G., Koszinowski, U.H., and Kloetzel, P.M. 1996b. A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature* **381**(6578): 166-168.
- Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., and Finley, D. 2000a. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* **7**(11): 1062-1067.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., and Huber, R. 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**(6624): 463-471.
- Groll, M., Kim, K.B., Kairies, N., Huber, R., and Crews, C.M. 2000b. Crystal Structure of Epoxomicin:20S Proteasome Reveals a Molecular Basis for Selectivity of α -Keto-Epoxyketone Proteasome Inhibitors. *Journal of the American Chemical Society* **122**(6): 1237-1238.
- Gudmundsson, G.H., Magnusson, K.P., Chowdhary, B.P., Johansson, M., Andersson, L., and Boman, H.G. 1995. Structure of the gene for porcine peptide antibiotic PR-39, a cathelin gene family member: comparative mapping of the locus for the human peptide antibiotic FALL-39. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(15): 7085-7089.
- Guzman, M.L., Swiderski, C.F., Howard, D.S., Grimes, B.A., Rossi, R.M., Szilvassy, S.J., and Jordan, C.T. 2002. Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(25): 16220-16225.
- Hai, T. and Curran, T. 1991. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(9): 3720-3724.
- Hanada, M., Sugawara, K., Kaneta, K., Toda, S., Nishiyama, Y., Tomita, K., Yamamoto, H., Konishi, M., and Oki, T. 1992. Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. *J Antibiot (Tokyo)* **45**(11): 1746-1752.
- Hartmann, E., Rapoport, T.A., and Lodish, H.F. 1989. Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(15): 5786-5790.
- Hartmann-Petersen, R., Tanaka, K., and Hendil, K.B. 2001. Quaternary structure of the ATPase complex of human 26S proteasomes determined by chemical cross-linking. *Arch Biochem Biophys* **386**(1): 89-94.
- Hassink, G., Kikkert, M., van Voorden, S., Lee, S.J., Spaapen, R., van Laar, T., Coleman, C.S., Bartee, E., Fruh, K., Chau, V., and Wiertz, E. 2005. TEB4 is a C4HC3 RING finger-containing ubiquitin ligase of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* **388**(Pt 2): 647-655.
- Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N., and Nakayama, K.I. 2001. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem* **276**(35): 33111-33120.
- Heink, S., Ludwig, D., Kloetzel, P.M., and Kruger, E. 2005. IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(26): 9241-9246.

- Helenius, A. and Aebi, M. 2004. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **73**: 1019-1049.
- Hendil, K.B., Khan, S., and Tanaka, K. 1998. Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes. *Biochem J* **332** (Pt 3): 749-754.
- Hendil, K.B., Kristensen, P., and Uerkevitz, W. 1995. Human proteasomes analysed with monoclonal antibodies. *Biochem J* **305** (Pt 1): 245-252.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**: 425-479.
- Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L., and Rose, I.A. 1980. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(4): 1783-1786.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S., and Ciechanover, A. 1983. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* **258**(13): 8206-8214.
- Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V.J., Elliott, P.J., Adams, J., and Anderson, K.C. 2001. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* **61**(7): 3071-3076.
- Hilberg, F., Aguzzi, A., Howells, N., and Wagner, E.F. 1993. c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature* **365**(6442): 179-181.
- Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K.B., Niwa, S., Kishimoto, T., Kasahara, M., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. 2006. Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Mol Cell* **24**(6): 977-984.
- Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. 2005. A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature* **437**(7063): 1381-1385.
- Hirano, Y., Kaneko, T., Okamoto, K., Bai, M., Yashiroda, H., Furuyama, K., Kato, K., Tanaka, K., and Murata, S. 2008. Dissecting beta-ring assembly pathway of the mammalian 20S proteasome. *Embo J* **27**(16): 2204-2213.
- Hirsch, C., Gauss, R., Horn, S.C., Neuber, O., and Sommer, T. 2009. The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature* **458**(7237): 453-460.
- Hong, M., Luo, S., Baumeister, P., Huang, J.M., Gogia, R.K., Li, M., and Lee, A.S. 2004. Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem* **279**(12): 11354-11363.
- Hong, W.K. and Sporn, M.B. 1997. Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science* **278**(5340): 1073-1077.
- Horn, S.C., Hanna, J., Hirsch, C., Volkwein, C., Schutz, A., Heinemann, U., Sommer, T., and Jarosch, E. 2009. Usa1 functions as a scaffold of the HRD-ubiquitin ligase. *Mol Cell* **36**(5): 782-793.
- Hough, R., Pratt, G., and Rechsteiner, M. 1986. Ubiquitin-lysozyme conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates. *J Biol Chem* **261**(5): 2400-2408.
- Hughes, B.T., Nwosu, C.C., and Espenshade, P.J. 2009. Degradation of sterol regulatory element-binding protein precursor requires the endoplasmic reticulum-associated degradation components Ubc7 and Hrd1 in fission yeast. *J Biol Chem* **284**(31): 20512-20521.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S., and Howley, P.M. 1995. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(11): 5249.
- Hurley, J.H., Lee, S., and Prag, G. 2006. Ubiquitin-binding domains. *Biochem J* **399**(3): 361-372.
- Husberg, C., Murphy, P., Bjorgo, E., Kalland, K.H., and Kolsto, A.B. 2003. Cellular localisation and nuclear export of the human bZIP transcription factor TCF11. *Biochim Biophys Acta* **1640**(2-3): 143-151.

- Husberg, C., Murphy, P., Martin, E., and Kolsto, A.B. 2001. Two domains of the human bZIP transcription factor TCF11 are necessary for transactivation. *J Biol Chem* **276**(21): 17641-17652.
- Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K.J., Finley, D., and Dikic, I. 2008. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature* **453**(7194): 481-488.
- Ikeda, H., Nishi, S., and Sakai, M. 2004. Transcription factor Nrf2/MafK regulates rat placental glutathione S-transferase gene during hepatocarcinogenesis. *Biochem J* **380**(Pt 2): 515-521.
- Ikeda, Y., Demartino, G.N., Brown, M.S., Lee, J.N., Goldstein, J.L., and Ye, J. 2009. Regulated endoplasmic reticulum-associated degradation of a polytopic protein: p97 RECRUITS PROTEASOMES TO Insig-1 BEFORE EXTRACTION FROM MEMBRANES. *J Biol Chem* **284**(50): 34889-34900.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., and Nabeshima, Y. 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* **236**(2): 313-322.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., and Yamamoto, M. 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* **13**(1): 76-86.
- Jaiswal, A.K. 2004. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* **36**(10): 1199-1207.
- Jin, L., Williamson, A., Banerjee, S., Philipp, I., and Rape, M. 2008. Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell* **133**(4): 653-665.
- Johnsen, O., Murphy, P., Prydz, H., and Kolsto, A.B. 1998. Interaction of the CNC-bZIP factor TCF11/LCR-F1/Nrf1 with MafG: binding-site selection and regulation of transcription. *Nucleic Acids Res* **26**(2): 512-520.
- Ju, D., Wang, L., Mao, X., and Xie, Y. 2004. Homeostatic regulation of the proteasome via an Rpn4-dependent feedback circuit. *Biochem Biophys Res Commun* **321**(1): 51-57.
- Kaneko, M., Ishiguro, M., Niinuma, Y., Uesugi, M., and Nomura, Y. 2002. Human HRD1 protects against ER stress-induced apoptosis through ER-associated degradation. *FEBS Lett* **532**(1-2): 147-152.
- Kaneko, T., Hamazaki, J., Iemura, S., Sasaki, K., Furuyama, K., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. 2009. Assembly pathway of the Mammalian proteasome base subcomplex is mediated by multiple specific chaperones. *Cell* **137**(5): 914-925.
- Kang, M.I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.G., and Yamamoto, M. 2004. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(7): 2046-2051.
- Kelly, A., Powis, S.H., Glynne, R., Radley, E., Beck, S., and Trowsdale, J. 1991. Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature* **353**(6345): 667-668.
- Kikkert, M., Doolman, R., Dai, M., Avner, R., Hassink, G., van Voorden, S., Thanedar, S., Roitelman, J., Chau, V., and Wiertz, E. 2004. Human HRD1 is an E3 ubiquitin ligase involved in degradation of proteins from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **279**(5): 3525-3534.
- Kim, H.T., Kim, K.P., Lledias, F., Kisselev, A.F., Scaglione, K.M., Skowyra, D., Gygi, S.P., and Goldberg, A.L. 2007. Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *J Biol Chem* **282**(24): 17375-17386.
- Kim, S.H., Lah, J.J., Thinakaran, G., Levey, A., and Sisodia, S.S. 2000. Subcellular localization of presenilins: association with a unique membrane pool in cultured cells. *Neurobiol Dis* **7**(2): 99-117.
- King, J. and Laemmli, U.K. 1971. Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J Mol Biol* **62**(3): 465-477.

- Kleijnen, M.F., Roelofs, J., Park, S., Hathaway, N.A., Glickman, M., King, R.W., and Finley, D. 2007. Stability of the proteasome can be regulated allosterically through engagement of its proteolytic active sites. *Nat Struct Mol Biol* **14**(12): 1180-1188.
- Kloetzel, P.M. 2004. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TAP. *Nat Immunol* **5**(7): 661-669.
- Kobayashi, A., Kang, M.I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., and Yamamoto, M. 2004a. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* **24**(16): 7130-7139.
- Kobayashi, A., Ohta, T., and Yamamoto, M. 2004b. Unique function of the Nrf2-Keap1 pathway in the inducible expression of antioxidant and detoxifying enzymes. *Methods Enzymol* **378**: 273-286.
- Kobayashi, M. and Yamamoto, M. 2006. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul* **46**: 113-140.
- Kopp, F., Dahlmann, B., and Kuehn, L. 2001. Reconstitution of hybrid proteasomes from purified PA700-20 S complexes and PA28alpha/beta activator: ultrastructure and peptidase activities. *J Mol Biol* **313**(3): 465-471.
- Kraft, D.C., Deocaris, C.C., Wadhwa, R., and Rattan, S.I. 2006. Preincubation with the proteasome inhibitor MG-132 enhances proteasome activity via the Nrf2 transcription factor in aging human skin fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* **1067**: 420-424.
- Kruger, E., Kloetzel, P.M., and Enenkel, C. 2001. 20S proteasome biogenesis. *Biochimie* **83**(3-4): 289-293.
- Kumatori, A., Tanaka, K., Inamura, N., Sone, S., Ogura, T., Matsumoto, T., Tachikawa, T., Shin, S., and Ichihara, A. 1990. Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(18): 7071-7075.
- Kwak, M.K., Wakabayashi, N., Greenlaw, J.L., Yamamoto, M., and Kensler, T.W. 2003. Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Mol Cell Biol* **23**(23): 8786-8794.
- Kwong, M., Kan, Y.W., and Chan, J.Y. 1999. The CNC basic leucine zipper factor, Nrf1, is essential for cell survival in response to oxidative stress-inducing agents. Role for Nrf1 in gamma-gcs(l) and gss expression in mouse fibroblasts. *J Biol Chem* **274**(52): 37491-37498.
- Le Tallec, B., Barrault, M.B., Courbeyrette, R., Guerois, R., Marsolier-Kergoat, M.C., and Peyroche, A. 2007. 20S proteasome assembly is orchestrated by two distinct pairs of chaperones in yeast and in mammals. *Mol Cell* **27**(4): 660-674.
- Le Tallec, B., Barrault, M.B., Guerois, R., Carre, T., and Peyroche, A. 2009. Hsm3/S5b participates in the assembly pathway of the 19S regulatory particle of the proteasome. *Mol Cell* **33**(3): 389-399.
- Lee, J.N., Song, B., DeBose-Boyd, R.A., and Ye, J. 2006. Sterol-regulated degradation of Insig-1 mediated by the membrane-bound ubiquitin ligase gp78. *J Biol Chem* **281**(51): 39308-39315.
- Lee, T.I. and Young, R.A. 2000. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* **34**: 77-137.
- Lee, W., Mitchell, P., and Tjian, R. 1987. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* **49**(6): 741-752.
- Leggett, D.S., Hanna, J., Borodovsky, A., Crosas, B., Schmidt, M., Baker, R.T., Walz, T., Ploegh, H., and Finley, D. 2002. Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Mol Cell* **10**(3): 495-507.
- Lehmann, A., Jechow, K., and Enenkel, C. 2008. Bim10 binds to pre-activated proteasome core particles with open gate conformation. *EMBO Rep* **9**(12): 1237-1243.
- Lenk, U., Yu, H., Walter, J., Gelman, M.S., Hartmann, E., Kopito, R.R., and Sommer, T. 2002. A role for mammalian Ubc6 homologues in ER-associated protein degradation. *J Cell Sci* **115**(Pt 14): 3007-3014.
- Levy, S., Jaiswal, A.K., and Forman, H.J. 2009. The role of c-Jun phosphorylation in E2F activation of phase II genes. *Free Radic Biol Med* **47**(8): 1172-1179.

- Li, W. and Kong, A.N. 2009. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog* **48**(2): 91-104.
- Li, W., Tu, D., Brunger, A.T., and Ye, Y. 2007. A ubiquitin ligase transfers preformed polyubiquitin chains from a conjugating enzyme to a substrate. *Nature* **446**(7133): 333-337.
- Liang, J., Yin, C., Doong, H., Fang, S., Peterhoff, C., Nixon, R.A., and Monteiro, M.J. 2006. Characterization of erasin (UBXD2): a new ER protein that promotes ER-associated protein degradation. *J Cell Sci* **119**(Pt 19): 4011-4024.
- Lilley, B.N. and Ploegh, H.L. 2004. A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* **429**(6994): 834-840.
- . 2005. Multiprotein complexes that link dislocation, ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(40): 14296-14301.
- Lim, P.J., Danner, R., Liang, J., Doong, H., Harman, C., Srinivasan, D., Rothenberg, C., Wang, H., Ye, Y., Fang, S., and Monteiro, M.J. 2009. Ubiquilin and p97/VCP bind erasin, forming a complex involved in ERAD. *J Cell Biol* **187**(2): 201-217.
- Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H.G., Reiss, Y., Groettrup, M., Momburg, F., Arnold, B., and Knolle, P.A. 2000. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* **6**(12): 1348-1354.
- Lindsten, K. and Dantuma, N.P. 2003. Monitoring the ubiquitin/proteasome system in conformational diseases. *Ageing Res Rev* **2**(4): 433-449.
- Liu, C.W., Li, X., Thompson, D., Wooding, K., Chang, T.L., Tang, Z., Yu, H., Thomas, P.J., and DeMartino, G.N. 2006. ATP binding and ATP hydrolysis play distinct roles in the function of 26S proteasome. *Mol Cell* **24**(1): 39-50.
- Low, T.L. and Goldstein, A.L. 1979. The chemistry and biology of thymosin. II. Amino acid sequence analysis of thymosin alpha1 and polypeptide beta1. *J Biol Chem* **254**(3): 987-995.
- Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., and Huber, R. 1995. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**(5210): 533-539.
- Lowe, J.B. 2003. Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation. *Curr Opin Cell Biol* **15**(5): 531-538.
- Luna, L., Johnsen, O., Skartlien, A.H., Pedeutour, F., Turc-Carel, C., Prydz, H., and Kolsto, A.B. 1994. Molecular cloning of a putative novel human bZIP transcription factor on chromosome 17q22. *Genomics* **22**(3): 553-562.
- Luna, L., Skammelsrud, N., Johnsen, O., Abel, K.J., Weber, B.L., Prydz, H., and Kolsto, A.B. 1995. Structural organization and mapping of the human TCF11 gene. *Genomics* **27**(2): 237-244.
- Maeda, T., Marutani, T., Zou, K., Araki, W., Tanabe, C., Yagishita, N., Yamano, Y., Amano, T., Michikawa, M., Nakajima, T., and Komano, H. 2009. An E3 ubiquitin ligase, Synoviolin, is involved in the degradation of immature nicastrin, and regulates the production of amyloid beta-protein. *Febs J* **276**(20): 5832-5840.
- Mannhaupt, G., Schnall, R., Karpov, V., Vetter, I., and Feldmann, H. 1999. Rpn4p acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Lett* **450**(1-2): 27-34.
- Mao, I., Liu, J., Li, X., and Luo, H. 2008. REGgamma, a proteasome activator and beyond? *Cell Mol Life Sci* **65**(24): 3971-3980.
- Marques, A.J., Palanimurugan, R., Matias, A.C., Ramos, P.C., and Dohmen, R.J. 2009. Catalytic mechanism and assembly of the proteasome. *Chem Rev* **109**(4): 1509-1536.
- Masdehors, P., Merle-Beral, H., Maloum, K., Omura, S., Magdelenat, H., and Delic, J. 2000. Deregulation of the ubiquitin system and p53 proteolysis modify the apoptotic response in B-CLL lymphocytes. *Blood* **96**(1): 269-274.
- Masdehors, P., Omura, S., Merle-Beral, H., Mentz, F., Cosset, J.M., Dumont, J., Magdelenat, H., and Delic, J. 1999. Increased sensitivity of CLL-derived lymphocytes to apoptotic

- death activation by the proteasome-specific inhibitor lactacystin. *Br J Haematol* **105**(3): 752-757.
- Matlack, K.E., Mothes, W., and Rapoport, T.A. 1998. Protein translocation: tunnel vision. *Cell* **92**(3): 381-390.
- McCarthy, J.V., Twomey, C., and Wujek, P. 2009. Presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis and gamma-secretase activity. *Cell Mol Life Sci* **66**(9): 1534-1555.
- McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J.D. 2006. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *J Biol Chem* **281**(34): 24756-24768.
- Medicherla, B. and Goldberg, A.L. 2008. Heat shock and oxygen radicals stimulate ubiquitin-dependent degradation mainly of newly synthesized proteins. *J Cell Biol* **182**(4): 663-673.
- Medicherla, B., Kostova, Z., Schaefer, A., and Wolf, D.H. 2004. A genomic screen identifies Dsk2p and Rad23p as essential components of ER-associated degradation. *EMBO Rep* **5**(7): 692-697.
- Meiners, S., Heyken, D., Weller, A., Ludwig, A., Stangl, K., Kloetzel, P.M., and Kruger, E. 2003. Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes. *J Biol Chem* **278**(24): 21517-21525.
- Meiners, S., Ludwig, A., Lorenz, M., Dreger, H., Baumann, G., Stangl, V., and Stangl, K. 2006. Nontoxic proteasome inhibition activates a protective antioxidant defense response in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* **40**(12): 2232-2241.
- Meng, L., Mohan, R., Kwok, B.H., Elofsson, M., Sin, N., and Crews, C.M. 1999. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(18): 10403-10408.
- Mimnaugh, E.G., Chen, H.Y., Davie, J.R., Celis, J.E., and Neckers, L. 1997. Rapid deubiquitination of nucleosomal histones in human tumor cells caused by proteasome inhibitors and stress response inducers: effects on replication, transcription, translation, and the cellular stress response. *Biochemistry* **36**(47): 14418-14429.
- Mueller, B., Klemm, E.J., Spooner, E., Claessen, J.H., and Ploegh, H.L. 2008. SEL1L nucleates a protein complex required for dislocation of misfolded glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(34): 12325-12330.
- Mueller, B., Lilley, B.N., and Ploegh, H.L. 2006. SEL1L, the homologue of yeast Hrd3p, is involved in protein dislocation from the mammalian ER. *J Cell Biol* **175**(2): 261-270.
- Muller, W.A. 2003. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* **24**(6): 327-334.
- Murata, S., Yashiroda, H., and Tanaka, K. 2009. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(2): 104-115.
- Musti, A.M., Treier, M., and Bohmann, D. 1997. Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science* **275**(5298): 400-402.
- Myhrstad, M.C., Husberg, C., Murphy, P., Nordstrom, O., Blomhoff, R., Moskaug, J.O., and Kolsto, A.B. 2001. TCF11/Nrf1 overexpression increases the intracellular glutathione level and can transactivate the gamma-glutamylcysteine synthetase (GCS) heavy subunit promoter. *Biochim Biophys Acta* **1517**(2): 212-219.
- Nandi, D., Woodward, E., Ginsburg, D.B., and Monaco, J.J. 1997. Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. *Embo J* **16**(17): 5363-5375.
- Nguyen, T., Sherratt, P.J., Huang, H.C., Yang, C.S., and Pickett, C.B. 2003. Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J Biol Chem* **278**(7): 4536-4541.
- Nguyen, T., Sherratt, P.J., Nioi, P., Yang, C.S., and Pickett, C.B. 2005. Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic

- pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J Biol Chem* **280**(37): 32485-32492.
- Nioi, P., McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J.D. 2003. Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem J* **374**(Pt 2): 337-348.
- Niture, S.K. and Jaiswal, A.K. 2009. Prothymosin- α mediates nuclear import of the INrf2/Cul3 Rbx1 complex to degrade nuclear Nrf2. *J Biol Chem* **284**(20): 13856-13868.
- Oda, Y., Okada, T., Yoshida, H., Kaufman, R.J., Nagata, K., and Mori, K. 2006. Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J Cell Biol* **172**(3): 383-393.
- Ohi, M.D., Vander Kooi, C.W., Rosenberg, J.A., Chazin, W.J., and Gould, K.L. 2003. Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. *Nat Struct Biol* **10**(4): 250-255.
- Ohtsuji, M., Katsuoka, F., Kobayashi, A., Aburatani, H., Hayes, J.D., and Yamamoto, M. 2008. Nrf1 and Nrf2 play distinct roles in activation of antioxidant response element-dependent genes. *J Biol Chem* **283**(48): 33554-33562.
- Ossendorp, F., Fu, N., Camps, M., Granucci, F., Gobin, S.J., van den Elsen, P.J., Schuurhuis, D., Adema, G.J., Lipford, G.B., Chiba, T., Sijts, A., Kloetzel, P.M., Ricciardi-Castagnoli, P., and Melief, C.J. 2005. Differential expression regulation of the α and β subunits of the PA28 proteasome activator in mature dendritic cells. *J Immunol* **174**(12): 7815-7822.
- Ozkaynak, E., Finley, D., Solomon, M.J., and Varshavsky, A. 1987. The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *Embo J* **6**(5): 1429-1439.
- Ozkaynak, E., Finley, D., and Varshavsky, A. 1984. The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature* **312**(5995): 663-666.
- Padmanabhan, B., Tong, K.I., Ohta, T., Nakamura, Y., Scharlock, M., Ohtsuji, M., Kang, M.I., Kobayashi, A., Yokoyama, S., and Yamamoto, M. 2006. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol Cell* **21**(5): 689-700.
- Panier, S. and Durocher, D. 2009. Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* **8**(4): 436-443.
- Perez-Galan, P., Roue, G., Villamor, N., Montserrat, E., Campo, E., and Colomer, D. 2006. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood* **107**(1): 257-264.
- Pickart, C.M. and Eddins, M.J. 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1695**(1-3): 55-72.
- Pilon, M., Schekman, R., and Romisch, K. 1997. Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *Embo J* **16**(15): 4540-4548.
- Plempner, R.K., Bordallo, J., Deak, P.M., Taxis, C., Hitt, R., and Wolf, D.H. 1999. Genetic interactions of Hrd3p and Der3p/Hrd1p with Sec61p suggest a retro-translocation complex mediating protein transport for ER degradation. *J Cell Sci* **112** (Pt 22): 4123-4134.
- Prester, T., Holtzclaw, W.D., Zhang, Y., and Talalay, P. 1993. Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(7): 2965-2969.
- Pugh, B.F. 2000. Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene* **255**(1): 1-14.
- Pugh, B.F. and Tjian, R. 1991. Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev* **5**(11): 1935-1945.
- Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E., and Woodgett, J.R. 1991. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**(6345): 670-674.

- Raab, M.S., Podar, K., Breitkreutz, I., Richardson, P.G., and Anderson, K.C. 2009. Multiple myeloma. *Lancet* **374**(9686): 324-339.
- Ramos, P.C., Hockendorff, J., Johnson, E.S., Varshavsky, A., and Dohmen, R.J. 1998. Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell* **92**(4): 489-499.
- Ramos-Gomez, M., Kwak, M.K., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., and Kensler, T.W. 2001. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(6): 3410-3415.
- Realini, C., Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K., and Rechsteiner, M. 1994. Molecular cloning and expression of a gamma-interferon-inducible activator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem* **269**(32): 20727-20732.
- Reyes-Turcu, F.E., Ventii, K.H., and Wilkinson, K.D. 2009. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* **78**: 363-397.
- Reyes-Turcu, F.E. and Wilkinson, K.D. 2009. Polyubiquitin binding and disassembly by deubiquitinating enzymes. *Chem Rev* **109**(4): 1495-1508.
- Richardson, P.G., Barlogie, B., Berenson, J., Singhal, S., Jagannath, S., Irwin, D., Rajkumar, S.V., Srkalovic, G., Alsina, M., Alexanian, R., Siegel, D., Orlowski, R.Z., Kuter, D., Limentani, S.A., Lee, S., Hideshima, T., Esseltine, D.L., Kauffman, M., Adams, J., Schenkein, D.P., and Anderson, K.C. 2003. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* **348**(26): 2609-2617.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., and Goldberg, A.L. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**(5): 761-771.
- Roelofs, J., Park, S., Haas, W., Tian, G., McAllister, F.E., Huo, Y., Lee, B.H., Zhang, F., Shi, Y., Gygi, S.P., and Finley, D. 2009. Chaperone-mediated pathway of proteasome regulatory particle assembly. *Nature* **459**(7248): 861-865.
- Roepcke, S., Zhi, D., Vingron, M., and Arndt, P.F. 2006. Identification of highly specific localized sequence motifs in human ribosomal protein gene promoters. *Gene* **365**: 48-56.
- Rotin, D. and Kumar, S. 2009. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(6): 398-409.
- Rushmore, T.H., Morton, M.R., and Pickett, C.B. 1991. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* **266**(18): 11632-11639.
- Saeki, Y., Kudo, T., Sone, T., Kikuchi, Y., Yokosawa, H., Toh-e, A., and Tanaka, K. 2009. Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *Embo J* **28**(4): 359-371.
- Saksena, S., Summers, M.D., Burks, J.K., Johnson, A.E., and Braunagel, S.C. 2006. Importin-alpha-16 is a translocon-associated protein involved in sorting membrane proteins to the nuclear envelope. *Nat Struct Mol Biol* **13**(6): 500-508.
- Sankaranarayanan, K. and Jaiswal, A.K. 2004. Nrf3 negatively regulates antioxidant-response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *J Biol Chem* **279**(49): 50810-50817.
- Sato, B.K. and Hampton, R.Y. 2006. Yeast Derlin Dfm1 interacts with Cdc48 and functions in ER homeostasis. *Yeast* **23**(14-15): 1053-1064.
- Sato, B.K., Schulz, D., Do, P.H., and Hampton, R.Y. 2009. Misfolded membrane proteins are specifically recognized by the transmembrane domain of the Hrd1p ubiquitin ligase. *Mol Cell* **34**(2): 212-222.
- Schafer, A. and Wolf, D.H. 2009. Sec61p is part of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *Embo J* **28**(19): 2874-2884.
- Schlesinger, D.H. and Goldstein, G. 1975. Molecular conservation of 74 amino acid sequence of ubiquitin between cattle and man. *Nature* **255**(5507): 42304.
- Schmidtke, G., Kraft, R., Kostka, S., Henklein, P., Frommel, C., Lowe, J., Huber, R., Klotzel, P.M., and Schmidt, M. 1996. Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the

- maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *Embo J* **15**(24): 6887-6898.
- Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle-Steinlein, U., Tian, J., Karin, M., Angel, P., and Wagner, E.F. 1999. Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev* **13**(5): 607-619.
- Schulze, A., Standera, S., Buerger, E., Kikkert, M., van Voorden, S., Wiertz, E., Koning, F., Kloetzel, P.M., and Seeger, M. 2005. The ubiquitin-domain protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum associated degradation pathway. *J Mol Biol* **354**(5): 1021-1027.
- Seifert, U., Bialy, L.P., Ebstein, F., Bech-Otschir, D., Voigt, A., Schroter, F., Prozorovski, T., Lange, N., Steffen, J., Rieger, M., Kuckelkorn, U., Aktas, O., Kloetzel, P.M., and Kruger, E. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* **142**(4): 613-624.
- Shibata, T., Ohta, T., Tong, K.I., Kokubu, A., Odogawa, R., Tsuta, K., Asamura, H., Yamamoto, M., and Hirohashi, S. 2008. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(36): 13568-13573.
- Shih Ie, M. and Wang, T.L. 2007. Notch signaling, gamma-secretase inhibitors, and cancer therapy. *Cancer Res* **67**(5): 1879-1882.
- Shimbara, N., Orino, E., Sone, S., Ogura, T., Takashina, M., Shono, M., Tamura, T., Yasuda, H., Tanaka, K., and Ichihara, A. 1992. Regulation of gene expression of proteasomes (multi-protease complexes) during growth and differentiation of human hematopoietic cells. *J Biol Chem* **267**(25): 18100-18109.
- Sifers, R.N., Brashears-Macatee, S., Kidd, V.J., Muensch, H., and Woo, S.L. 1988. A frameshift mutation results in a truncated alpha 1-antitrypsin that is retained within the rough endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **263**(15): 7330-7335.
- Sijts, A., Sun, Y., Janek, K., Kral, S., Paschen, A., Schadendorf, D., and Kloetzel, P.M. 2002. The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing. *Mol Immunol* **39**(3-4): 165-169.
- Singh, A., Misra, V., Thimmulappa, R.K., Lee, H., Ames, S., Hoque, M.O., Herman, J.G., Baylin, S.B., Sidransky, D., Gabrielson, E., Brock, M.V., and Biswal, S. 2006. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med* **3**(10): e420.
- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D.A., Birrer, M., and Karin, M. 1991. Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* **354**(6353): 494-496.
- Song, B.L., Sever, N., and DeBose-Boyd, R.A. 2005. Gp78, a membrane-anchored ubiquitin ligase, associates with Insig-1 and couples sterol-regulated ubiquitination to degradation of HMG CoA reductase. *Mol Cell* **19**(6): 829-840.
- Spence, J., Sadis, S., Haas, A.L., and Finley, D. 1995. A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* **15**(3): 1265-1273.
- Stewart, D., Killeen, E., Naquin, R., Alam, S., and Alam, J. 2003. Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem* **278**(4): 2396-2402.
- Stitzel, N.O., Mar, B.G., Liang, J., and Westbrook, C.A. 2004. Membrane-associated and secreted genes in breast cancer. *Cancer Res* **64**(23): 8682-8687.
- Sun, Z., Zhang, S., Chan, J.Y., and Zhang, D.D. 2007. Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Mol Cell Biol* **27**(18): 6334-6349.
- Suzuki, T., Park, H., and Lennarz, W.J. 2002. Cytoplasmic peptide:N-glycanase (PNGase) in eukaryotic cells: occurrence, primary structure, and potential functions. *Faseb J* **16**(7): 635-641.
- Takabe, W., Kodama, T., Hamakubo, T., Tanaka, K., Suzuki, T., Aburatani, H., Matsukawa, N., and Noguchi, N. 2001. Anti-atherogenic antioxidants regulate the expression and function of proteasome alpha-type subunits in human endothelial cells. *J Biol Chem* **276**(44): 40497-40501.

- Takabe, W., Mataka, C., Wada, Y., Ishii, M., Izumi, A., Aburatani, H., Hamakubo, T., Niki, E., Kodama, T., and Noguchi, N. 2000. Gene expression induced by BO-653, probucol and BHQ in human endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* **7**(4): 223-230.
- Takabe, W., Matsukawa, N., Kodama, T., Tanaka, K., and Noguchi, N. 2006. Chemical structure-dependent gene expression of proteasome subunits via regulation of the antioxidant response element. *Free Radic Res* **40**(1): 21-30.
- Tanahashi, N., Murakami, Y., Minami, Y., Shimbara, N., Hendil, K.B., and Tanaka, K. 2000. Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J Biol Chem* **275**(19): 14336-14345.
- Toki, T., Itoh, J., Kitazawa, J., Arai, K., Hatakeyama, K., Akasaka, J., Igarashi, K., Nomura, N., Yokoyama, M., Yamamoto, M., and Ito, E. 1997. Human small Maf proteins form heterodimers with CNC family transcription factors and recognize the NF-E2 motif. *Oncogene* **14**(16): 1901-1910.
- Tong, K.I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T., and Yamamoto, M. 2006a. Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol Cell Biol* **26**(8): 2887-2900.
- Tong, K.I., Kobayashi, A., Katsuoka, F., and Yamamoto, M. 2006b. Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol Chem* **387**(10-11): 1311-1320.
- Unno, M., Mizushima, T., Morimoto, Y., Tomisugi, Y., Tanaka, K., Yasuoka, N., and Tsukihara, T. 2002. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure* **10**(5): 609-618.
- Ustrell, V., Hoffman, L., Pratt, G., and Rechsteiner, M. 2002. PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *Embo J* **21**(13): 3516-3525.
- van den Heuvel, S. 2004. Protein degradation: CUL-3 and BTB--partners in proteolysis. *Curr Biol* **14**(2): R59-61.
- van Hall, T., Sijts, A., Camps, M., Offringa, R., Melief, C., Kloetzel, P.M., and Ossendorp, F. 2000. Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. *J Exp Med* **192**(4): 483-494.
- van Wijk, S.J., de Vries, S.J., Kemmeren, P., Huang, A., Boelens, R., Bonvin, A.M., and Timmers, H.T. 2009. A comprehensive framework of E2-RING E3 interactions of the human ubiquitin-proteasome system. *Mol Syst Biol* **5**: 295.
- Venugopal, R. and Jaiswal, A.K. 1998. Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* **17**(24): 3145-3156.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Koonin, E.V., and Deshaies, R.J. 2002. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* **298**(5593): 611-615.
- Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Kang, M.I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T.W., and Talalay, P. 2004. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(7): 2040-2045.
- Wang, W. and Chan, J.Y. 2006. Nrf1 is targeted to the endoplasmic reticulum membrane by an N-terminal transmembrane domain. Inhibition of nuclear translocation and transacting function. *J Biol Chem* **281**(28): 19676-19687.
- Watai, Y., Kobayashi, A., Nagase, H., Mizukami, M., McEvoy, J., Singer, J.D., Itoh, K., and Yamamoto, M. 2007. Subcellular localization and cytoplasmic complex status of endogenous Keap1. *Genes Cells* **12**(10): 1163-1178.
- Watanabe, Y., Suzuki, O., Haruyama, T., and Akaike, T. 2003. Interferon-gamma induces reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress at the hepatic apoptosis. *J Cell Biochem* **89**(2): 244-253.
- Wattenberg, L.W. 1985. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res* **45**(1): 1-8.
- Wiborg, O., Pedersen, M.S., Wind, A., Berglund, L.E., Marcker, K.A., and Vuust, J. 1985. The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences. *Embo J* **4**(3): 755-759.

- Wiertz, E.J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A., and Ploegh, H.L. 1996. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* **384**(6608): 432-438.
- Wilkinson, K.D., Urban, M.K., and Haas, A.L. 1980. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* **255**(16): 7529-7532.
- Witt, E., Zantopf, D., Schmidt, M., Kraft, R., Kloetzel, P.M., and Kruger, E. 2000. Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(beta 5i) incorporation into 20 S proteasomes. *J Mol Biol* **301**(1): 1-9.
- Wolf, D.H. and Hilt, W. 2004. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta* **1695**(1-3): 19-31.
- Wolfenden, R. and Snider, M.J. 2001. The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. *Acc Chem Res* **34**(12): 938-945.
- Worthylake, R.A. and Burridge, K. 2001. Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr Opin Cell Biol* **13**(5): 569-577.
- Xie, Y. and Varshavsky, A. 2001. RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: a negative feedback circuit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(6): 3056-3061.
- Xing, W., Singgih, A., Kapoor, A., Alarcon, C.M., Baylink, D.J., and Mohan, S. 2007. Nuclear factor-E2-related factor-1 mediates ascorbic acid induction of osterix expression via interaction with antioxidant-responsive element in bone cells. *J Biol Chem* **282**(30): 22052-22061.
- Xu, P., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., and Peng, J. 2009. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* **137**(1): 133-145.
- Yamasaki, S., Yagishita, N., Nishioka, K., and Nakajima, T. 2007. The roles of synoviolin in crosstalk between endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and p53 pathway. *Cell Cycle* **6**(11): 1319-1323.
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. 2000. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* **6**(6): 1355-1364.
- Ye, Y., Meyer, H.H., and Rapoport, T.A. 2001. The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* **414**(6864): 652-656.
- . 2003. Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J Cell Biol* **162**(1): 71-84.
- Ye, Y., Shibata, Y., Kikkert, M., van Voorden, S., Wiertz, E., and Rapoport, T.A. 2005. Inaugural Article: Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(40): 14132-14138.
- Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D., and Rapoport, T.A. 2004. A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* **429**(6994): 841-847.
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., and Mori, K. 2000. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* **20**(18): 6755-6767.
- Younger, J.M., Chen, L., Ren, H.Y., Rosser, M.F., Turnbull, E.L., Fan, C.Y., Patterson, C., and Cyr, D.M. 2006. Sequential quality-control checkpoints triage misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Cell* **126**(3): 571-582.
- Younger, J.M., Ren, H.Y., Chen, L., Fan, C.Y., Fields, A., Patterson, C., and Cyr, D.M. 2004. A foldable CFTR{Delta}F508 biogenic intermediate accumulates upon inhibition of the Hsc70-CHIP E3 ubiquitin ligase. *J Cell Biol* **167**(6): 1075-1085.
- Zaiss, D.M., Standera, S., Holzthutter, H., Kloetzel, P., and Sijts, A.J. 1999. The proteasome inhibitor PI31 competes with PA28 for binding to 20S proteasomes. *FEBS Lett* **457**(3): 333-338.

- Zavacki, A.M., Arrojo, E.D.R., Freitas, B.C., Chung, M., Harney, J.W., Egri, P., Wittmann, G., Fekete, C., Gereben, B., and Bianco, A.C. 2009. The E3 ubiquitin ligase TEB4 mediates degradation of type 2 iodothyronine deiodinase. *Mol Cell Biol* **29**(19): 5339-5347.
- Zhang, Y., Crouch, D.H., Yamamoto, M., and Hayes, J.D. 2006. Negative regulation of the Nrf1 transcription factor by its N-terminal domain is independent of Keap1: Nrf1, but not Nrf2, is targeted to the endoplasmic reticulum. *Biochem J* **399**(3): 373-385.
- Zhang, Y., Kobayashi, A., Yamamoto, M., and Hayes, J.D. 2009a. The Nrf3 transcription factor is a membrane-bound glycoprotein targeted to the endoplasmic reticulum through its N-terminal homology box 1 sequence. *J Biol Chem* **284**(5): 3195-3210.
- Zhang, Y., Lucocq, J.M., and Hayes, J.D. 2009b. The Nrf1 CNC/bZIP protein is a nuclear envelope-bound transcription factor that is activated by t-butyl hydroquinone but not by endoplasmic reticulum stressors. *Biochem J* **418**(2): 293-310.
- Zhang, Y., Lucocq, J.M., Yamamoto, M., and Hayes, J.D. 2007. The NHB1 (N-terminal homology box 1) sequence in transcription factor Nrf1 is required to anchor it to the endoplasmic reticulum and also to enable its asparagine-glycosylation. *Biochem J* **408**(2): 161-172.

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere - Maßeinheit für die Stromstärke
AAA ⁺ -ATPase	„ATPase associated with various cellular activities“
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	„base pairs“ - Basenpaare
C	Celsius
cDNA	„copy“ Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dpm	„disintegrations per minute“ - Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
EMSA	„Electrophoretic Mobility Shift Assay“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum
Flag	Oktapeptid mit der Sequenz DYKDDDDK
for	forward
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HA	Peptid aus Hemagglutinin des humanen Influenza Virus (YPYDVPDYA)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
kDa	kilo Dalton, Molekulargewichtseinheit
l	Liter
LB	Luria Bertani

lacZ	Genname der β -Galactosidase in <i>Escherichia coli</i>
M	Molarität (Mol/Liter)
m	Meter
m, μ , n, f	milli (10^{-3}), micro (10^{-6}), nano (10^{-9}), femto (10^{-12})
mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minute
MOPS	3-[Morpholino]propansulfonsäure
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
myc	Peptid aus dem Protein c-myc (EQKLISEEDL)
NP-40	Nonident P-40
ORF	„open reading frame“
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat gepufferte Saline
poly dI/dC	Polymer aus Desoxyinosin und Desoxycytosin
PP _i	Pyrophosphat - Diphosphat
rev	reverse
RIPA	„Radio Immuno Precipitation Assay“
rpm	„revolutions per minute“ - Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription - Polymerasekettenreaktion
S	Svedberg - Sedimentationskoeffizient
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
shRNA	„small hairpin“ Ribonukleinsäure
siRNA	„small interfering“ Ribonukleinsäure
Tab.	Tabelle
TBS	Tris gepufferte Saline
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt - Maßeinheit der elektrischen Spannung
v/v	„volume per volume“
V5	Peptid mit der Sequenz GKIPNPLLGLDST
w/o	„without“ - ohne
w/v	„weight per volume“

Publikationen

Publizierte Artikel

Fricke, B., Heink, S., **Steffen, J.**, Kloetzel, P.M., and Kruger, E. 2007. The proteasome maturation protein POMP facilitates major steps of 20S proteasome formation at the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep* **8**(12): 1170-1175.

Seifert, U., Bialy, L.P., Ebstein, F., Bech-Otschir, D., Voigt, A., Schroter, F., Prozorovski, T., Lange, N., **Steffen, J.**, Rieger, M., Kuckelkorn, U., Aktas, O., Kloetzel, P.M., and Kruger, E. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* **142**(4): 613-624.

Artikel in Druck

Steffen, J., Seeger, M., Koch, A., and Kruger, E. 2010. Proteasomal degradation is transcriptionally controlled by TCF11 via an ERAD dependent feedback loop. *Mol Cell*

Poster

Steffen, J., Heyken, D., Kloetzel, P.-M., and Krüger, E. Transcription factors of the oxidative defense machinery induce *de novo* formation of mammalian constitutive proteasomes and the ubiquitin system to compensate for inhibition of proteasome activity.
11.-14. November 2008, *ZOMES V MEETING*, RIKEN Yokohama Institut, Japan.

Steffen, J., Koch, A., and Krüger, E. The transcription factor TCF11 induces *de novo* formation of proteasomes to compensate for inhibition of proteasome activity.
24.-26. September 2009, *6TH FABISCH-SYMPOSIUM FOR CANCER RESEARCH AND MOLECULAR CELL BIOLOGY*, Berlin, Deutschland.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. P.-M. Kloetzel, dass ich ein so interessantes Thema für meine Dissertation in seinen Laboratorien bearbeiten durfte.

Vor allem danke ich meiner Betreuerin Prof. Dr. Elke Krüger für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit und dass sie mir immer mit Ratschlägen zur Seite stand.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Michael Groll und Herrn Prof. Dr. Andreas Herrmann für die Bereitschaft, meine Dissertation zu begutachten und für den damit verbundenen Zeitaufwand.

Allen Mitarbeitern des Krüger Labors danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und die nette Arbeitsatmosphäre. Ein ganz besonderer Dank gilt Annett für ihre ständige Bereitschaft sich Probleme anzuhören und zu besprechen.

Alex danke ich für den vielen Spaß im und außerhalb des Labors. Ohne ihn wäre so mancher Tag im Labor doch erheblich öder gewesen.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kloetzel für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft. Dabei sind ganz besonders Melanie, Nicole, Thorsten, Andrea und Frédéric zu erwähnen.

Franziska danke ich ebenfalls ganz außerordentlich für ihre Diskussionsbereitschaft und das kritische Korrekturlesen.

Ich bedanke mich ganz besonders auch bei Inge, die sehr viel Zeit und Geduld für das Korrekturlesen meiner Arbeit aufbrachte.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, weil sie jederzeit hinter mir stehen und mich bei meinen Vorhaben stets unterstützen.

Erklärung

Hiermit versichere ich, die Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Berlin, 25.01.2010

(Janos Steffen)

Anhang

Tab. 1: Durch die Inhibition der proteasomalen Aktivität oder die Überexpression von TCF11 wird ein Großteil der im UPS involvierten Gene vermehrt transkribiert Ea.hy926 Zellen wurden entweder mit 10 oder 20 nM Epoxomicin (Epox) behandelt oder mit einem Expressionskonstrukt für TCF11 transfiziert. Nach 24 h wurde in beiden Ansätzen die RNA aus den Zellen isoliert und die Expression der UPS Gene mit einem microarray (Human U133 2.0 Plus; Affimetrix) untersucht.

fache Zunahme der Transkription

Gen Name	Art	10 nM (Epox)	20 nM (Epox)	TCF11
E1-Enzyme				
UBE1L2		2.5	4.4	unverändert
E2-Enzyme				
CDC34		1.1	1.6	unverändert
UBE2W		1.7	2.5	1.3
FTS		2.2	1.9	unverändert
UBE2Q2		1.5	2.2	unverändert
UBE2F		1.4	1.8	1.3
HIP2		1.8	2.0	1.4
TRIAD3		1.2	1.5	1.4
UBE2A		1.7	1.8	1.2
UBE2B		1.4	1.8	1.2
UBE2D1		2.9	5.1	1.7
UBE2D3		1.4	2.0	1.8
UBE2E1		1.2	1.8	unverändert
UBE2E2		1.9	2.4	1.4
UBE2G1		1.5	1.7	unverändert
UBE2H		1.7	2.7	unverändert
UBE2J1		2.0	1.9	unverändert
UBE2Q1		1.6	1.5	unverändert
Kua		1.8	1.8	1.2
VPS37A		2.8	3.0	1.4
E3-Enzyme und Komponenten				
EDD1 /// LOC730429	hect	2.7	2.5	unverändert
WWP1	hect	2.0	2.2	unverändert
HECTD1	hect	1.7	2.0	unverändert
HECTD2	hect	2.3	2.7	unverändert
HECW2	hect	1.6	2.2	1.8
HERC4	hect	2.1	2.2	unverändert
ITCH	hect	3.8	5.9	1.4
NEDD4L	hect	2.1	2.1	unverändert
SMURF1	hect	1.6	2.2	unverändert
TRIP12	hect	1.9	2.3	unverändert
UBE3A	hect	1.5	1.7	unverändert
UBE3C	hect	1.3	1.6	1.3
AMFR	ring	1.5	1.6	unverändert
ANKIB1	ring	1.3	1.5	1.2
ARIH1	ring	1.8	2.5	unverändert
BIRC4	ring	3.5	7.3	1.5
BIRC6	ring	2.1	2.0	1.3
BRAP	ring	1.7	1.7	unverändert

Gen Name	Art	fache Zunahme der Transkription		
		10 nM (EpoX)	20 nM (EpoX)	TCF11
TBL1XR1	ring	1.9	1.7	unverändert
CBL	ring	1.7	2.3	unverändert
CBLB	ring	5.0	4.7	unverändert
CBLL1	ring	2.4	3.2	1.6
CGRRF1	ring	1.4	2.2	unverändert
CNOT4	ring	1.6	2.3	1.3
DTX3	ring	1.4	1.8	1.2
ANAPC1	ring	1.6	2.2	unverändert
NFXL1	ring	1.3	1.5	unverändert
IBRDC1	ring	1.7	1.9	unverändert
IBRDC3	ring	2.5	2.8	unverändert
RC3H1	ring	1.6	3.3	unverändert
LOC51136	ring	2.6	1.9	unverändert
LRSAM1	ring	1.5	1.5	1.3
MARCH5	ring	2.3	2.7	unverändert
MARCH6	ring	1.7	2.6	unverändert
MARCH7	ring	2.3	3.3	unverändert
MARCH8	ring	1.7	1.7	1.2
MDM2	ring	2.4	4.4	unverändert
MDM4	ring	0.8	1.9	1.5
MKRN1	ring	1.5	1.7	unverändert
MKRN2	ring	1.8	1.8	unverändert
MNAB	ring	1.4	2.6	1.3
MYLIP	ring	1.8	3.5	1.5
PCGF1	ring	0.9	1.7	1.3
PIAS1	ring	1.6	1.8	unverändert
PIAS2	ring	2.2	1.5	1.3
PJA1	ring	1.7	1.6	unverändert
PJA2	ring	2.2	2.3	unverändert
RCHY1	ring	1.1	1.7	1.2
RFFL	ring	2.4	2.1	1.8
TRIM13	ring	1.4	1.9	unverändert
RFWD2	ring	2.1	1.5	unverändert
RKHD2	ring	1.6	3.0	unverändert
RKHD3	ring	2.5	1.8	unverändert
RNF10	ring	1.9	2.0	unverändert
RNF103	ring	1.8	2.3	unverändert
RNF11	ring	1.4	1.7	1.3
RNF111	ring	1.9	3.3	unverändert
RNF12	ring	2.0	2.8	1.4
RNF126	ring	1.0	1.8	unverändert
RNF13	ring	1.6	1.8	1.5
RNF138	ring	1.4	2.0	unverändert
RNF139	ring	1.3	1.6	unverändert
RNF14	ring	2.8	2.7	unverändert
RNF146	ring	2.6	2.8	1.5
RNF149 /// LOC731208	ring	2.4	3.5	1.3
RNF19	ring	1.5	1.8	unverändert
RNF24	ring	1.3	1.5	unverändert
RNF25	ring	1.1	1.6	1.3
RNF32	ring	1.4	1.5	1.3
RNF38	ring	2.1	3.0	1.2
RNF3A	ring	1.5	1.9	1.3

Gen Name	Art	fache Zunahme der Transkription		
		10 nM (EpoX)	20 nM (EpoX)	TCF11
RNF41	ring	1.5	2.1	unverändert
RNF44	ring	1.6	2.2	unverändert
RNF6	ring	2.1	2.9	1.2
SH3RF1	ring	1.4	1.7	unverändert
SIAH1	ring	2.2	2.3	unverändert
SYVN1	ring	2.3	2.6	unverändert
TRAF5	ring	1.5	1.7	unverändert
TRAF6	ring	1.6	2.2	unverändert
TRIM2	ring	4.9	4.6	1.5
TRIM23	ring	1.3	2.3	unverändert
TRIM26	ring	1.2	1.5	unverändert
TRIM33	ring	2.1	2.4	unverändert
TRIM36	ring	2.1	2.5	unverändert
TRIM52	ring	1.2	1.7	1.2
CLDN12	ring	2.2	2.6	1.2
TRIM62	ring	1.3	1.5	unverändert
UBR1	ring	2.1	2.8	1.3
ZNF650	ring	2.4	2.2	unverändert
UBE4B	ring	2.5	1.9	1.5
CUL1	cullin	1.4	1.6	unverändert
CUL3	cullin	1.5	1.7	1.3
CUL4A	cullin	1.7	1.7	unverändert
CUL5	cullin	1.3	1.9	unverändert
FBXL11	F-box	1.8	2.0	1.2
FBXL12	F-box	1.3	1.5	unverändert
FBXL2	F-box	1.6	1.5	unverändert
FBXL20	F-box	2.0	2.1	unverändert
FBXO11	F-box	1.5	1.9	unverändert
FBXO3	F-box	1.5	1.6	unverändert
FBXO30	F-box	2.4	3.4	1.7
FBXO32	F-box	1.8	1.9	1.2
FBXO33	F-box	1.1	1.6	unverändert
FBXO38	F-box	1.5	1.6	unverändert
FBXO6	F-box	1.4	1.5	unverändert
FBXO7	F-box	1.8	1.5	unverändert
FBXO8	F-box	3.9	2.6	unverändert
BTRC/ FBXW1	F-box	1.7	1.9	unverändert
FBXW11	F-box	1.4	1.8	unverändert
FBXW7	F-box	2.1	2.1	1.4
ASB3	SOCS	2.1	1.8	1.3
ASB6	SOCS	1.4	1.7	unverändert
ASB7	SOCS	1.9	3.6	unverändert
ASB8	SOCS	1.4	1.9	1.3
RAB40B	SOCS	1.5	1.7	unverändert
SOCS1	SOCS	1.5	1.6	1.5
SOCS2	SOCS	2.3	1.5	unverändert
SOCS4	SOCS	1.5	1.5	unverändert
SOCS5	SOCS	1.5	1.8	unverändert
SOCS6	SOCS	2.6	5.3	2.1
SOCS7	SOCS	1.2	1.5	unverändert

Gen Name	Art	fache Zunahme der Transkription		
		10 nM (EpoX)	20 nM (EpoX)	TCF11
TCEB3	socs	1.5	2.1	unverändert
TULP4	socs	1.6	1.5	1.5
WSB1	socs	1.5	1.6	unverändert
WSB2	socs	1.7	1.8	unverändert
KBTBD8	btb	7.7	21.3	1.3
BACH1	btb	3.4	3.7	1.2
BCL6	btb	1.6	1.9	unverändert
BTBD14A	btb	1.8	2.3	unverändert
BTBD3	btb	1.5	1.6	unverändert
ZBTB46	btb	1.6	1.5	unverändert
BTBD5	btb	1.5	1.7	1.4
BTBD7	btb	1.6	2.0	unverändert
C16orf44	btb	1.5	1.7	unverändert
KLHL24	btb	2.7	6.1	unverändert
ZBTB41	btb	2.4	2.4	1.3
GAN	btb	1.4	1.6	1.3
HIC2	btb	1.0	1.9	unverändert
IBTK	btb	2.0	1.8	1.3
KBTBD9	btb	2.2	2.0	unverändert
KLHL20	btb	1.2	1.5	unverändert
KLHL15	btb	1.3	1.8	unverändert
KLHL18	btb	1.4	1.6	unverändert
KLHL2	btb	1.4	1.5	1.2
KLHL21	btb	2.5	2.6	unverändert
KLHL5	btb	1.4	1.6	1.7
KLHL7	btb	1.4	1.5	1.3
LOC339745	btb	2.2	3.1	unverändert
MYNN	btb	1.4	1.9	unverändert
ZBTB10	btb	2.8	7.6	unverändert
ZBTB20	btb	1.4	2.4	1.4
ZBTB24	btb	1.2	1.9	unverändert
ZBTB26	btb	2.5	4.1	1.3
ZBTB34	btb	2.2	5.3	1.3
ZBTB4	btb	1.2	1.5	unverändert
ZNF295	btb	1.7	2.0	unverändert
ZBTB43	btb	1.9	4.6	1.3
GZF1	btb	1.6	2.2	unverändert
ZBTB6	btb	2.9	2.3	1.3
ZNF509	btb	1.8	2.0	1.2
UBR2	clpS	1.8	2.5	1.4
Deubiquitinierende Enzyme				
ATXN3		1.1	1.6	1.2
USPL1		1.5	2.6	unverändert
CYLD		2.7	4.3	unverändert
OTUD5		2.2	2.1	unverändert
YOD1		1.9	4.2	1.3
OTUD4		0.8	1.5	unverändert
JOSD1		2.1	2.1	unverändert
MYSM1		1.6	1.5	unverändert
ZFAND3		1.4	2.0	unverändert
TNFAIP3		2.4	3.6	unverändert
UCHL1		1.5	1.6	1.6

fache Zunahme der Transkription				
Gen Name	Art	10 nM (EpoX)	20 nM (EpoX)	TCF11
UFD1L		1.5	1.6	1.3
USP12		1.3	2.4	unverändert
USP14		1.6	1.7	unverändert
USP15		1.6	2.0	1.3
USP16		1.3	1.7	unverändert
USP24		1.3	1.5	unverändert
USP32		1.3	2.0	unverändert
USP33		1.7	2.1	1.3
USP34		1.6	1.6	unverändert
USP35		1.4	2.7	unverändert
USP36		1.8	4.5	unverändert
USP38		2.4	2.0	unverändert
USP42		1.3	1.7	unverändert
USP46		2.0	2.7	unverändert
USP47		1.8	2.8	1.2
USP53		3.0	4.3	unverändert
USP6		1.1	1.5	unverändert
USP9X		1.3	1.5	unverändert
VCPIP1		1.8	1.7	1.4
OTUD7B		1.4	1.8	1.2
ZRANB1		1.4	2.0	unverändert
Ubiquitin				
UBC		1.6	1.7	unverändert
ERAD Komponenten				
VCP		2.0	1.7	1.3
UFD1L		1.5	1.7	1.3
UBXD2		1.7	1.8	1.3
UBQLN1		1.8	2.0	1.5
DERL1		2.2	1.7	1.2